

Tesis de Posgrado

Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos : Aislamiento y caracterización de mutantes de escape

Tami, María Cecilia

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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:

Tami, María Cecilia. (1999). Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos : Aislamiento y caracterización de mutantes de escape. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3184_Tami.pdf

Cita tipo Chicago:

Tami, María Cecilia. "Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos : Aislamiento y caracterización de mutantes de escape". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3184_Tami.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Evaluación de vacunas peptídicas contra el
virus de la fiebre aftosa en bovinos.
Aislamiento y caracterización de mutantes
de escape**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas

Lic. María Cecilia Tami

Director: Dr. Eduardo L. Palma

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

1999

Nº 31845

Agradecimientos

Fueron tantos los que me ayudaron a estar, por fin, escribiendo estas páginas!!! Para mí fue un gran placer compartir todos estos años con todos ustedes y, como la vida siempre da oportunidades, he aquí la mía para hacer expreso mi inmenso agradecimiento hacia todos y cada uno de los que me acompañaron durante esta etapa.

Al Dr. Palma, mi querido director, a quien admiro y respeto profundamente en lo profesional y especialmente en lo humano. A usted quiero agradecerle que le haya dedicado el tiempo que no tenía a la discusión de estos resultados, que me haya guiado y estimulado para seguir adelante y que siempre haya sido tan cálido y afectuoso conmigo.

A Oscar, a quien quiero tanto. Tabo quiero agradecerte tu infinita paciencia y tolerancia. Lo mucho que me enseñaste, tu ayuda incondicional, las eternas horas de flujo cantando a dúo, las rimas, los famosos “vamos a festejar” (que tanto extraño), tus clases de latín, tus inagotables ganas de empezar cosas nuevas, las incansables discusiones científicas, y ni hablar de las de psicología!! Y tantas, tantas otras cosas que siempre voy a guardar en mi memoria.

A Lela, por su gran bondad. Lelus te agradezco que hayas revisado cada una de las líneas de estas páginas, los muchos experimentos que me sugeriste y cuyos resultados discutimos juntas, que me hayas enseñado a disfrutar de los pequeños logros y que me hayas auxiliado ininidad de veces, especialmente en los últimos tiempos.

Analía, siempre estuviste dispuesta a ayudarme; Gaby, me encantó reencontrarte en el INTA! Andrea, gracias por tu dulzura y Flavia, gracias por tu compañerismo. A Erica y a Dino, los recuerdo siempre con mucho cariño.

A mis amigas del alma:

Dani, me consolaste en tantos momentos difíciles. Ceci, me alentaste y me contuviste siempre. Pauli, siempre te preocupaste por mí. Lauri, siempre estuviste tan cerca, a pesar de la distancia. Fabi, por tu manera de ver las cosas y Eleo, por apoyarme siempre. Cuantos momentos inolvidables compartidos! Las quiero un montón!

Silvito, gracias por tu increíble ingenio! Cuantas veces me hiciste reír con tus anécdotas de Saint George!

A M.E. Piccone, que me enseñó a valorar mis resultados; a Silvina, Guido y Ariel, que fueron tan buenos buenos compañeros conmigo.

A Osvaldo y a Esteban, porque siempre me brindaron su confianza y ayuda incondicional.

A Angel, Marisa y Alicia, por su calidez, sus consejos e infaltables palabras de aliento.

A Jorgito, porque su ayuda en los experimentos de bovinos fue imprescindible y por tantos otros favores.

A Alicia Arese, Paz, Martín, Karina, Andrea, Marisa F., Lorena, Laura, Marisa L, Nora, Marcela, Valeria, por los lindos momentos compartidos. A Haydée y a Tere, por haber sido tan afectuosas conmigo.

A Ale. T, Nilda, Caro, Marianne, Norma, Vero, Luis y Eduardo, muchas gracias por su cariño y colaboración; a Ale E., por sus piropos de pasillo y a Andrea D. por ser siempre tan cariñosa conmigo.

A Diego, Sebas y Mariana, por las rondas de mate compartidas y por la ayuda que me brindaron; a Ana por las consultas estadísticas y muy especialmente a Mercedes, por su amistad y por el mini-curso cibernético.

A Isa, Berta, Fabián, Susana y Vilma, que siempre me recibieron con una sonrisa y me facilitaron el material que necesité.

A Osvaldo, Tere y Estela, por su cordialidad y buen humor.

A Ani y a Marta, por haber sido siempre tan amables conmigo y a Claudia, que siempre me dió una mano.

A Eva y a Mary, que fueron mis cómplices en la difícil tarea de interceptar al Dr. Palma. A ambas y también a Perla, les agradezco que siempre estuvieran dispuestas para todo lo que les pidiera.

A la memoria de Dr. Marcovecchio y Daniel Barbona, que siempre estarán presentes.

Mi agradecimiento al Dr. Esteban Domingo, al Dr. Mauricio García Mateu y al Dr. Francisco Sobrino, por su valiosísima contribución a este trabajo.

Al Instituto de Patobiología del INTA, por encargarse del manejo de los bovinos.

A la Dra. Ana María Sadir, por su colaboración y especialmete por responder tan amablemente a mis consultas.

Al INTA, mi segundo hogar y a mi facultad, en la que pasé tantas horas de mi vida.

A todos, muchas gracias! Fue un privilegio compartir todos estos años con ustedes!

A mi mamá y a mi papa, los quiero tanto, tanto, tanto... Gracias por su incondicionalidad, su testimonio de amor y entrega, por contenerme y consolarme, por sus miradas tiernas y amorosas, por ser siempre mi sostén y por hacerme sentir tan amada. A ellos les dedico este trabajo.

A Vivi, mi hermana adorada, por ser mi confidente y por sus inagotables palabras de aliento. A mis hermanos Willy, Rodol y Fede. Los quiero muchísimo!

A Ale, mi Cuquito del alma. Por inundar mi vida de luz. Porque sé que a su lado nada es imposible y porque este es otro pequeño logro de los dos. Te amo con todo el corazón!

INDICE

| | |
|--|-----------|
| Indice | 1 |
| Abreviaturas | 6 |
| Resumen | 8 |
| Abstract | 10 |
| | |
| I. INTRODUCCION | 11 |
| 1. La fiebre aftosa | 11 |
| 1.1 Generalidades | 11 |
| 1.2 Importancia económica y distribución geográfica | 12 |
| 1.3 La fiebre aftosa en la Argentina | 13 |
| 1.4 Control de la fiebre aftosa | 14 |
| 2. El virus de la fiebre aftosa | 15 |
| 2.1 La partícula viral | 15 |
| | |
| 2.2 El genoma del VFA | 18 |
| 2.3 Ciclo de replicación viral | 21 |
| 3. Variabilidad genética del VFA | 22 |
| 3.1 Mecanismos de generación de variabilidad genética en los virus a ARN | 22 |
| 3.2 Las poblaciones de VFA son cuasiespecies | 24 |
| 3.3 Heterogeneidad genética del VFA | 25 |
| 4. Diversidad antigénica del VFA | 26 |
| 4.1 Antigenicidad | 26 |
| 4.2 Los sitios antigénicos en los diferentes serotipos | 27 |
| 4.3 Variabilidad en los sitios antigénicos | 28 |
| 4.4 Bases moleculares de la variabilidad genética | 30 |
| 5. Respuesta inmune frente al VFA | 32 |
| 5.1 Respuesta inmune humoral | 33 |
| 5.2 Respuesta inmune celular | 34 |
| 5.3 Influencia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en la respuesta inmune frente al VFA | 36 |
| 6. La vacunación contra el VFA | 37 |
| 6.1 Vacunas inactivadas contra el VFA | 38 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 6.2 | Vacunas experimentales contra el VFA | 40 |
| 6.2.1 | Vacunas a virus vivo modificado | 41 |
| 6.2.2 | Vacunas a subunidades | 42 |
| 6.2.3 | Partículas vacías | 43 |
| 6.2.4 | Vacunas a péptidos sintéticos | 44 |
| II. | OBJETIVOS | 47 |
| III. | MATERIALES Y METODOS | 48 |
| 1. | Virus | 48 |
| 2. | Células | 48 |
| 3. | Péptidos sintéticos | 48 |
| 4. | Oligonucleótidos | 50 |
| 5. | Anticuerpos monoclonales | 51 |
| 6. | Animales de experimentación | 52 |
| 7. | Vacunación de bovinos con péptidos sintéticos | 54 |
| 7.1 | Inactivación del virus infectivo | 54 |
| 7.2 | Formulación de las vacunas | 54 |
| 7.3 | Vacunación y desafío | 54 |
| 7.4 | Esquemas de vacunación | 55 |
| 7.5 | Experimento de vacunación N° 1 | 55 |
| 7.6 | Experimento de vacunación N° 2 | 56 |
| 7.7 | Experimento de vacunación N° 3 | 57 |
| 7.8 | Experimento de vacunación N° 4 | 57 |
| 7.9 | Experimento de vacunación N° 5 | 57 |
| 8. | Toma de muestras | 58 |
| 8.1 | Sangre | 58 |
| 8.2 | Lesiones | 58 |
| 9. | Producción de virus C3 Argentina 85 | 59 |
| 9.1 | Virus utilizado en el desafío y en los ensayos de seroneutralización | 59 |
| 9.2 | Virus para estimulación de linfocitos | 59 |
| 10. | Titulación de stocks virales | 60 |
| 10.1 | Titulación por ensayo de placas | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 10.2 Titulación en ratón lactante | 60 |
| 11. Ensayos de linfoproliferación | 61 |
| 12. Seroprotección en ratón lactante | 62 |
| 13. Ensayos de neutralización de la infectividad viral | 62 |
| 13.1 Neutralización con sueros de bovinos | 63 |
| 13.2 Neutralización con anticuerpos monoclonales | 63 |
| 14. Caracterización genómica de los aislamientos virales | 64 |
| 14.1 Aislamiento de ARN viral. | 64 |
| 14.1.a Extracción de ARN de lesiones | 64 |
| 14.1.b Extracción de ARN viral de sobrenadante de células infectadas | 64 |
| 14.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) | 65 |
| 14.3 Reacción de PCR | 65 |
| 14.4 Purificación de los fragmentos obtenidos por RT-PCR | 67 |
| 14.5 Secuenciación de ácidos nucleicos | 67 |
| 15. Amplificación de las mutantes virales rescatadas de lesiones de bovinos | 69 |
| 16. Caracterización de las variantes de escape mediante ensayos de ELISA con anticuerpos monoclonales | 69 |
| 17. Pasajes sucesivos de variantes de escape en presencia de presión inmunológica | 70 |
| 18. Curvas de crecimiento | 71 |
| 19. Análisis del polimorfismo del exón II del gen DRB3 del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) bovino por PCR-RFLP | 72 |
| 19.1 Aislamiento de ADN de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) | 72 |
| 19.2 Amplificación del exón II del gen DRB3 | 73 |
| 19.3 Detección de alelos del exón II del gen DRB3 | 74 |
| IV. RESULTADOS | 75 |
| I. Respuesta inmune en bovinos vacunados con péptidos sintéticos | 75 |
| I.1 Evaluación de la respuesta inmune inducida en bovinos por diferentes dosis de péptidos sintéticos utilizando un esquema de inmunización corto | 75 |
| I.2 Evaluación de la respuesta inmune y la protección frente al desafío en bovinos inmunizados con péptidos sintéticos utilizando un esquema de | |

| | |
|---|------------|
| vacunación intermedio | 79 |
| I.3 Evaluación de la protección en bovinos conferida por los péptidos A, AT y ACT siguiendo el esquema de inmunización corto | 82 |
| I.4 Efecto de diferentes esquemas de vacunación en la respuesta inmune y protección conferidas por el péptido A | 87 |
| I.5 Análisis de la influencia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad bovino en la respuesta a los péptidos sintéticos | 92 |
| II Análisis y caracterización del VFA recuperado de lesiones de bovinos no protegidos frente al desafío viral | 98 |
| II.1 Determinación de la secuencia nucleotídica de la región correspondiente al sitio A de los virus rescatados de las lesiones de bovinos no protegidos | 98 |
| II.2 Amplificación en cultivo de células de las variantes virales recuperadas de bovinos no protegidos | 102 |
| II.3 Caracterización fenotípica de las variantes virales recuperadas de bovinos no protegidos | 104 |
| II.3.a Tamaño de placa y título viral | 104 |
| II.3.b Curvas de crecimiento | 108 |
| II.4 Caracterización genómica de las variantes virales | 109 |
| II.5 Caracterización antigénica de las variantes virales utilizando sueros policlonales provenientes de bovinos vacunados con péptidos sintéticos | 112 |
| II.5.a Neutralización de la infectividad viral de las variantes 9 PTD y 40 PDD | 112 |
| II.5.b Pasajes seriados de las variantes virales en presencia de sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos | 117 |
| II.6 Caracterización de las variantes virales con un panel de anticuerpos monoclonales continuos y discontinuos generados contra virus aftoso de serotipo C | 122 |
| II.6.a Caracterización antigénica mediante ensayos de ELISA | 122 |
| II.6.b Caracterización antigénica mediante ensayos de neutralización de la infectividad viral | 123 |
| V. DISCUSION | 127 |
| I. La vacunación de bovinos con péptidos sintéticos | 127 |
| I.1 Evaluación de la protección conferida a bovinos por péptidos sintéticos | |

| | |
|--|------------|
| que representan secuencias del VFA C3 Argentina 85. | 128 |
| I.2 Efecto de diferentes condiciones de inmunización en la respuesta inmune y protección conferida por péptidos sintéticos | 129 |
| I.3 Relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección al desafío | 131 |
| I.4 Relación entre la dosis protectora 50% en ratón lactante y la protección al desafío | 131 |
| I.5 Relación entre las subclases de IgG y la protección al desafío | 132 |
| I.6. Relación entre los índices de linfoproliferación y la protección frente al desafío | 134 |
| I.7 Influencia de la composición de alelos del exón II del gen DRB3 de clase II de la población de bovinos en la respuesta a péptidos sintéticos | 136 |
| II. Mutantes de escape aisladas de bovinos vacunados con péptidos sintéticos | 138 |
| II.1 Análisis de la mutación R(141)→G | 139 |
| II.2 Análisis de la mutación L(144)→P | 143 |
| II.3 Análisis de la mutación L(147)→P | 145 |
| II.4 Posibles razones para explicar la ausencia de protección | 148 |
| III. Consideraciones finales | 150 |
| | |
| VI. CONCLUSIONES | 152 |
| | |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 155 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| AcM: | Anticuerpo monoclonal |
| ADN: | Acido desoxiribonucleico |
| ADNc: | ADN copia |
| APS: | Persulfato de amonio |
| ARN: | Acido ribonucleico |
| BHK-21: | Línea celular de riñón de hamster lactante |
| BoLA | Antígenos linfocitarios bovinos |
| CEE: | Comunidad Económica Europea |
| CMH: | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| CMSP: | Células mononucleares de sangre periférica |
| cpm: | Cuentas por minuto |
| Da: | Daltons |
| ddNTPs | Dideoxiribonucleótidos trifosfato |
| DEPC: | Dietilpirocarbonato |
| DIRL50% | Dosis infecciosa ratón lactante 50% |
| dNTPs | Deoxiribonucleótidos trifosfato |
| dpi: | Días post infección |
| DPRL50%: | Dosis protectora ratón lactante 50% |
| EDTA: | Acido etilendiamino tetraacético |
| FA: | Fiebre aftosa |
| Hepes: | Acido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico |
| Ig: | Inmunoglobulina |
| Kb: | Kilobases |
| Kda: | Kilodaltons |
| log: | Logaritmo en base 10 |
| MEM-D: | Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco |
| MEM-E: | Medio mínimo esencial de Eagle |
| moi: | Multiplicidad de infección |
| nm: | Nanometros |
| nt: | Nucleótidos |
| OIE: | Organización Internacional de Epizootias |

| | |
|--------|---|
| pb: | Pares de bases |
| PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PM: | Peso molecular |
| RFB: | Riñón fetal bovino |
| RFLP: | Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción |
| rpm: | Revoluciones por minuto |
| RT: | Retrotranscripción |
| S: | Svedberg |
| SDS: | Dodecil sulfato de sodio |
| TEMED: | N,N,N',N'-tetrametilendiamina |
| TSN: | Título seroneutralizante |
| ufp: | Unidades formadoras de placa |
| VFA: | Virus de la fiebre aftosa |
| VIAA: | Antígeno asociado a la infección viral |

**Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos.
Aislamiento y caracterización de mutantes de escape.**

El virus de la fiebre aftosa (VFA) pertenece a la familia *Picornaviridae* y es el agente causal de la fiebre aftosa (FA). Esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas en el mundo y se controla mediante vacunación regular con una vacuna a virus inactivado. Esta vacuna presenta desventajas relacionadas principalmente con la manipulación de grandes cantidades de virus vivo y la inactivación incompleta de las preparaciones virales. En este trabajo se evaluó el potencial de vacunas peptídicas representando los sitios antigénicos A y C derivados del VFA serotipo C3 unidos a un epítopo para células T derivado del VFA de serotipo O, como alternativa a las vacunas convencionales. Con este fin, se realizaron 5 experimentos de vacunación que involucraron 120 bovinos en total y se estudiaron los efectos de diferentes esquemas de vacunación y distintas dosis de inmunógeno. En cada experimento se evaluó la inducción de anticuerpos neutralizantes, la linfoproliferación en respuesta a antígenos virales y la protección frente al desafío con virus homólogo. Los mayores niveles de protección alcanzados fueron del 40% y no fue posible establecer una correlación entre protección y título de anticuerpos neutralizantes o respuesta linfoproliferativa frente a virus entero.

En 12 de 29 lesiones rescatadas de los bovinos vacunados con péptidos sintéticos que no resultaron protegidos frente al desafío viral, se aislaron virus mutantes con sustituciones aminoacídicas únicas en la región del sitio A, en posiciones críticas para la antigenicidad del VFA. Las posiciones que se vieron alteradas fueron R (141) →G, incluida en el triplete RGD altamente conservado en los diferentes serotipos de VFA, L (144) →P y L (147) →P. Las variantes virales se caracterizaron fenotípicamente en cuanto al tamaño de placa y a su velocidad de crecimiento y antigénicamente mediante ensayos de ELISA y neutralización con un panel de anticuerpos monoclonales secuenciales y conformacionales. Los resultados mostraron que las sustituciones L(144)-P y L(147)-P tienen un efecto muy importante en la antigenicidad del VFA y afectaron múltiples epítopos dentro del sitio antigénico A. La mutación R(141)-G, en cambio, tuvo un efecto menor afectando sólo la reactividad con un AcM.

Se discuten las posibles modificaciones en la formulación de las vacunas peptídicas para aumentar su capacidad protectora y las implicancias de las sustituciones aminoacídicas encontradas en las variantes virales.

Palabras claves: vacunas peptídicas, VFA, mutantes de escape de VFA, respuesta inmune, heterogeneidad antigénica del VFA.

ABSTRACT

Evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease in cattle. Isolation and characterization of escape mutants

Foot-and-mouth disease virus (FMDV) belongs to the *Picornaviridae* family and is the causative agent of foot-and-mouth disease (FMD). FMD is the economically most important disease of cattle and other farm animals and its control is based on regular vaccination with an inactivated whole-virus vaccine. However, there are several disadvantages in the use of such vaccines related to the risk of reintroduction of the disease by the handling of large amounts of infectious virus or by incomplete inactivation of the antigen. In this work, the potential of peptide vaccines bearing antigenic site A and C regions and a T-cell epitope of FMDV serotype C3, was evaluated as an alternative to conventional vaccines. For this purpose, 5 different vaccination experiments, involving a total of 120 bovines, were carried out and the effects of modifications in the timing of the immunizations and of different doses of peptides were studied. Induction of neutralizing antibodies, lymphoproliferation in response to viral antigens and protection against challenge with homologous infectious virus were examined. The highest level of protection achieved was of 40% and protection showed a limited correlation with serum neutralization activity and lymphoproliferation in response to whole virus.

In 12 out of 29 lesions from peptide vaccinated cattle that were not protected after challenge, FMDV mutants with a unique amino acid substitutions at antigenic site A, were identified. The replacements found were R(141)-G, at the highly conserved RGD motif, L(144)-P and L(147)-P. The results showed that substitutions L(144)-P and L(147)-P were critically involved in FMDV antigenicity affecting multiple epitopes within antigenic site A. However, substitution R(141)-G had a minor effect, affecting the reactivity of just one Mab. Variant viruses were also phenotypically and antigenically characterized.

Possible modifications of the vaccine formulation to increase protective activity as well as implications of the substitutions identified in the viral mutants are discussed.

Key words: peptide vaccines, FMDV, FMDV escape mutants, immune response, antigenic heterogeneity of FMDV.

I. Introducción

1. La fiebre aftosa

1.1 Generalidades

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a animales de pezuña partida, principalmente bovinos y porcinos (Pereira y col., 1981). También afecta al ganado caprino, ovino y a más de 30 especies de animales silvestres como llamas, antílopes, ciervos y jabalíes, entre otros (Forman y Gibbs, 1974). La enfermedad fue descrita por primera vez en Italia por Frascatorius en el año 1546 (Frascatorius, 1546). El virus de la fiebre aftosa, agente causal de la fiebre aftosa, fue identificado por Loeffler y Frosch en 1897 y es el primer virus animal reconocido.

La FA se caracteriza por la aparición de un cuadro febril inicial seguido por la formación de lesiones vesiculares o aftas en mucosas y en ciertos epitelios principalmente en las mucosas de la boca y la nariz, en pezones y espacios interdigitales (Schudel y Sadir, 1986). La aparición de las vesículas dificulta la alimentación y la movilidad de los animales afectados (Shahan, 1962).

El virus penetra por vía respiratoria o a través de los epitelios de la boca o la nariz, replica rápidamente en las células epiteliales del punto de entrada y da lugar a la formación de una vesícula o afta primaria. Al cabo de 3 ó 4 días, el virus pasa a torrente sanguíneo y origina una viremia. Se distribuye entonces por todo el organismo alcanzando epitelios alejados del punto de entrada, provocando la aparición de aftas secundarias.

Durante la fase aguda de la enfermedad se encuentran altos niveles de virus en todas las secreciones y los aerosoles derivados principalmente de los conductos respiratorios, en la sangre, órganos, tejidos y excreciones (Burrows, 1968). El virus es fácilmente transmisible de animales infectados a animales susceptibles por contacto directo a través de la saliva, leche y semen, por inhalación, ingestión o penetración de partículas infecciosas en lesiones de la piel (Cottral y col., 1968, Hyslop, 1965, Sellers, 1971), ya que se necesitan muy pocas partículas infecciosas para iniciar un proceso infeccioso. La enfermedad puede ser transmitida también en forma indirecta por medio de productos animales contaminados (Cottral y col., 1960), restos de animales, equipos agrícolas, ropa, personas, etc.

Los niveles de mortalidad de la enfermedad en animales adultos no superan el 5% y la evolución de los individuos infectados es benigna, con regeneración de los tejidos dañados. La respuesta inmune contra el virus es responsable de la desaparición de la viremia y de la reconstitución de los tejidos dañados.

Sin embargo, en animales jóvenes la infección puede producir miocarditis y elevar la tasa de mortalidad a niveles de hasta el 50%. Si bien la mayor parte de los animales adultos infectados se recupera completamente de la enfermedad, un número variable puede convertirse en portador asintomático de la enfermedad. El estado de portador puede durar desde pocas semanas hasta años y puede producirse también luego de infecciones subclínicas o en animales con inmunidad insuficiente.

Los animales portadores representan un reservorio natural del virus ya que el mismo permanece en la faringe. Es posible recuperar virus infeccioso de la región orofaríngea de los animales portadores en forma intermitente por largos períodos de tiempo luego de la infección (Sutmoller y col., 1968, Van Bekkum y col., 1959). La importancia del estado portador radica no sólo en la permanencia de virus infeccioso en el campo como fuente de inóculo, sino también en la aparición de nuevas variantes debido a la posibilidad de aparición de cambios antigénicos en el virus durante su replicación en estos animales (Fagg y Hyslop, 1966, Gebauer y col., 1988). Estas nuevas variantes pueden escapar a la inmunidad generada por las vacunas en el resto de la población susceptible.

1.2 Importancia económica y distribución geográfica

A pesar de que la FA presenta bajos índices de mortalidad, es una de las enfermedades del ganado que causa mayores pérdidas económicas en el mundo. Los animales afectados presentan una pérdida del peso corporal importante como consecuencia de las lesiones presentes en la boca y las patas y una reducción en la productividad de carne y leche, lo que puede disminuir su rendimiento económico hasta un 25%. A estos factores se suman los altos costos implicados en la implementación de las medidas de control y programas de erradicación. Sin embargo, las pérdidas económicas más importantes se deben a las restricciones impuestas por los países libres de la enfermedad a la comercialización de carnes y subproductos de origen animal provenientes de los países del circuito aftósico.

La facilidad de diseminación del VFA y su elevada contagiosidad son las causas principales de que la FA se encuentre ampliamente distribuida en el mundo. La fiebre aftosa es endémica en África, parte de Asia y de Sudamérica. Los países de la Comunidad Económica Europea (CEE), América del Norte y Central, Chile, Uruguay, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Singapur, Indonesia, Malta y países escandinavos tienen el reconocimiento internacional de países libres de FA y aplican estrictas medidas sanitarias ante posibles focos para mantener el estado de países libres de la enfermedad.

En la CEE, la erradicación de la FA se logró mediante campañas de vacunación que se suspendieron en el año 1991. Sin embargo, en febrero de 1993 ocurrieron varios brotes en Italia que obligaron a eliminar miles de cabezas de ganado y en 1994 y 1996 se reportaron varios brotes en Grecia (Kitching, 1998). América del Sur, Chile y Uruguay son países libres de la enfermedad. En el Uruguay no se han registrado brotes de la enfermedad desde 1990 y ha sido declarado libre de la enfermedad en el año 1994 por la Organización Internacional de Epizootias (OIE). En la Argentina, en abril de 1997 se cumplieron 3 años sin presencia clínica de FA por lo que en la actualidad es considerado internacionalmente como país libre con vacunación, habiéndose dejado de vacunar en abril de 1999. El Paraguay posee el status de país libre de FA con práctica de vacunación.

1.3 La fiebre aftosa en la Argentina

En nuestro país, el sector agropecuario cumple un rol protagónico en la economía. Las exportaciones provenientes de este sector tienen una gran influencia en el intercambio comercial y dan lugar a una intensa actividad industrial (industria frigorífica, láctea y veterinaria, entre otras). La FA ha ocasionado grandes pérdidas económicas al país estimadas en aproximadamente 1.000 millones de dólares anuales, producto de las pérdidas directas causadas por la enfermedad, de la diferencia en el precio existente entre los circuitos aftósico y no aftósico y de la importante caída en el volumen de las exportaciones.

En la Argentina no se han reportado brotes de la enfermedad desde abril de 1994 y fue declarada libre de aftosa con práctica de vacunación en mayo de 1997 por la OIE. Esta nueva situación permitió un aumento importante de los volúmenes y precios de las exportaciones a los mercados ya existentes, así como también la apertura de nuevos mercados. La Argentina ha tenido vedado el acceso al mercado estadounidense desde hace 60 años por la FA. El nuevo *status* de nuestro país permitió que los Estados Unidos destrabaran el ingreso de carne vacuna proveniente de la Argentina en junio de 1997.

La vacunación en la Argentina ha cesado en abril de 1999. Sin embargo, esta medida debe contemplar algunos problemas tales como la posibilidad de aparición de brotes, la disponibilidad de un banco de vacunas y el control estricto de las fronteras. A mediados de enero se detectó un brote de FA serotipo O en el estado brasilero de Mato Grosso do Sul luego de 4 años de ausencia de brotes. A pesar del *status* del Paraguay de país libre con vacunación, el brote fue inicialmente atribuido a ganado infectado presente en el límite del Paraguay, aunque finalmente no se encontraron evidencias de la enfermedad en

ese país.

En el año 1998 hubo 370 casos sospechados de FA en nuestro país. Sin embargo, todos ellos probaron ser negativos. Antes de que se sugiriera a abril de 1999 como fecha límite de vacunación, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) evaluó 58.000 animales, incluyendo animales salvajes, y todos ellos resultaron negativos. Este hecho podría sugerir que no existe más virus circulante en el país lo cual avala la discusión de detener definitivamente la vacunación en la Argentina (Animal Pharm., 1998).

1.4 Control de la fiebre aftosa

Los factores que dificultan el control de la FA son muy variados. Entre ellos se encuentra la alta contagiosidad de la enfermedad, la complejidad de la respuesta inmune, la variación antigénica del virus, la diversidad de hospedadores y la existencia de portadores asintomáticos. Sin embargo, mediante la implementación de medidas de control severas y sistemáticas ha sido posible erradicar la FA de varios países.

En América del Sur se realizan campañas de vacunación preventiva de todo el ganado y seguimiento epidemiológico de cualquier foco de la enfermedad (Alonso-Fernandez y col., 1981). Los focos son más frecuentes en las áreas de cría extensiva, en las que muchas veces resulta difícil la vacunación de todo el rodeo y el movimiento de animales vivos ayuda al traslado del agente infeccioso. Estas regiones presentan complicaciones adicionales como el nacimiento de terneros que incrementan la cantidad de animales susceptibles y la existencia de fauna silvestre que constituye un importante reservorio natural.

Las vacunas utilizadas en los programas de erradicación de la enfermedad son a virus inactivado químicamente, formuladas en adyuvante oleoso o acuoso. La inmunidad protectora es de menor duración que la conferida por la infección, necesitándose vacunar 1 ó 2 veces al año cuando se utilizan vacunas oleosas y 3 ó 4 veces al año en el caso de las vacunas acuosas. También se han utilizado vacunas a virus atenuado, como es el caso de Venezuela.

En la Argentina, el Plan Nacional de Control de la FA 90-92 basó su estrategia en el reconocimiento de los diferentes ecosistemas de la enfermedad y en la organización de productores, técnicos y fuerzas productivas regionales y nacionales. Incluyó además, la vacunación periódica y preventiva de todo el ganado con una vacuna de calidad controlada (potencia, inocuidad y esterilidad), la denuncia y atención temprana de focos y el inicio de tareas de vigilancia epidemiológica. La implementación de este plan permitió

disminuir el número de focos y restringir geográficamente la enfermedad.

El Plan Nacional 93-97, consolidó las estrategias técnicas y operativas del plan anterior, tanto en la lucha activa como en la vigilancia epidemiológica.

En los países libres de la enfermedad, el control se lleva a cabo mediante un estricto control de la importación de animales o productos derivados, la vigilancia epidemiológica en todo el territorio, en especial en las fronteras, y en la capacidad de realizar un diagnóstico rápido. Los brotes de FA se eliminan mediante la aplicación del "riflo sanitario" que implica el sacrificio de los animales infectados y expuestos (Cottral, 1975). Los ganaderos son instruidos para declarar los brotes y son indemnizados por el gobierno (Bachrach, 1968). Aunque estos procedimientos resultan costosos, los perjuicios ocasionados por la FA justifican tal inversión (Mc Cauley, 1977).

En algunos países como Dinamarca y Mexico (brotes de 1946 a 1953) se utilizó un método que combina el sacrificio de los animales infectados con la vacunación zonal alrededor del foco infeccioso (Bachrach, 1968).

2. El virus de la fiebre aftosa

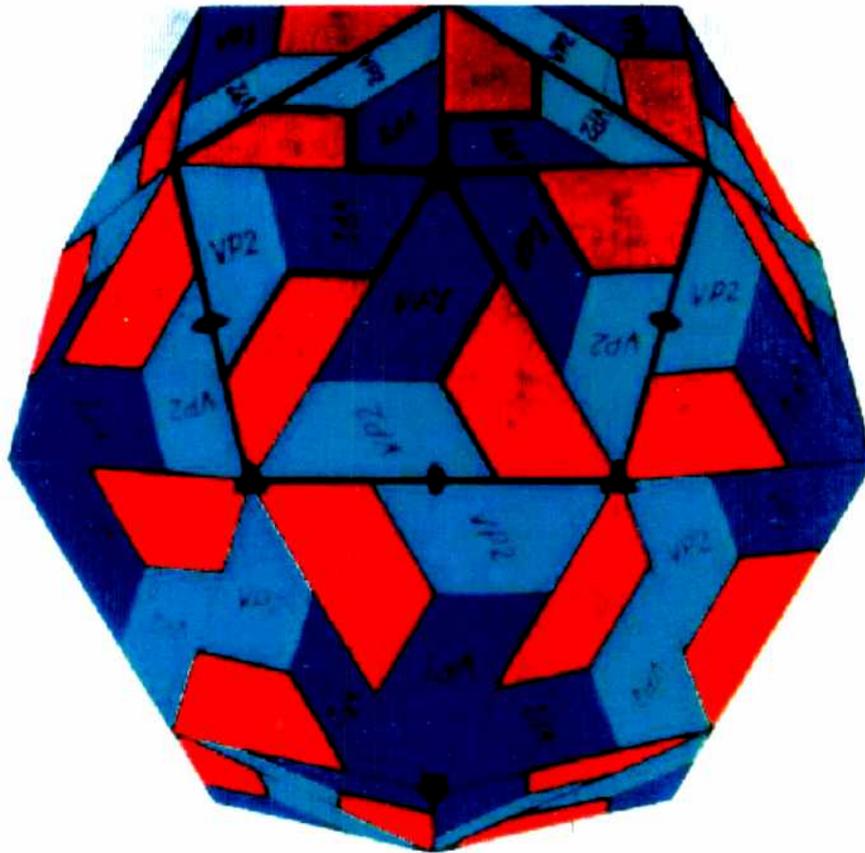
El virus de la fiebre aftosa (VFA) es el único representante del género *aphthovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*.

2.1 La partícula viral

El genoma del VFA está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva, de un tamaño aproximado a 8450 nucleótidos (Carroll y col., 1984). La partícula infectiva tiene un diámetro de aproximadamente 25 nm (Vásquez y col., 1979), con una cápside proteica, desnuda, de simetría icosaédrica 5:3:2 (Figura 1). La cápside está compuesta por sesenta copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales, denominadas VP1 a VP4, de pesos moleculares de 27 y 30 kDa para VP1, VP2 y VP3, respectivamente y de 9 a 10 kDa para VP4 (Boothroyd y col., 1989). Esta última está miristilada y se localiza internamente (Boothroyd y col., 1982; Chow y col., 1987). Una copia de VP1, VP2 y VP3 se agrupan para formar un protómero; cinco protómeros se agrupan para formar un pentámero, la subunidad 12S (Vasquez y col., 1972), que constituye cada una de las caras del icosaedro. Doce pentámeros constituyen la cara externa de la partícula viral (Talbot y col., 1973). El virión contiene además 1 ó 2 copias

de dos proteínas minoritarias VP0, precursor de VP2 y VP4 (Forss y col., 1984), y la polimerasa viral 3D (Newman y col. 1994).

Figura 1: Representación esquemática de la cápside del VFA



Se indican los ejes de simetría quintuple (◆), triple (▲) y doble (♦). Los cinco protómeros alrededor del eje de simetría quintuple se indican con trazo grueso. La proteína VP1 se indica en azul, VP2 en celeste y VP3 en rojo (Arnold y col., 1987).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 adoptan una configuración espacial similar (Acharya y col., 1989). Cada cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma varias veces para dar origen a una estructura conocida como barril β , que consiste de ocho cadenas con estructura

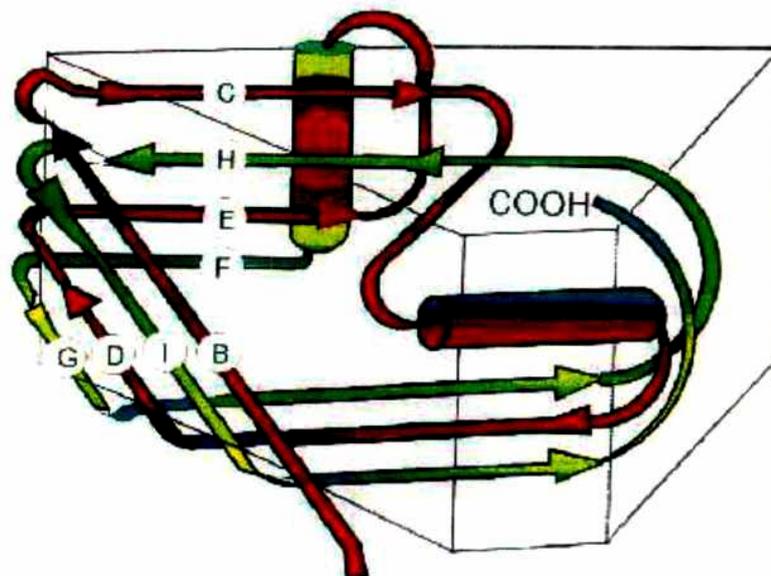
secundaria de lámina β ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por bucles o *loops* expuestos al medio externo (Hogle y col., 1985). Las cadenas β forman las paredes del barril y se denominan con letras (A, B, C, etc.). Los "loops" se denominan según las letras de las cadenas β que conectan (Figura 2).

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146S y alta densidad en cloruro de cesio (1,43-1,45 g/cm³). Es inestable a pH ácido y a altas temperaturas.

La partícula 146S es fácilmente dissociable por tratamiento a pH < 7 en subunidades virales 12S (Rueckert, 1985) que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3 y un precipitado insoluble que contiene a VP4 (Burroughs y col., 1971).

Luego de las infecciones virales es posible obtener también otra clase de partículas, con un coeficiente de sedimentación de 75S. Estas partículas son cápsides vacías, un producto naturalmente defectivo que contiene moléculas de VP1, VP2 y el precursor VP0, pero no contienen ARN.

Figura 2: Representación esquemática del motivo "barril β " que adoptan las proteínas VP1, VP2 y VP3 (Hogle y col., 1985).



2.2 El genoma del VFA

Como en todos los Picornavirus, el genoma del VFA está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva. La longitud del ARN viral es de aproximadamente 8500 bases, con un peso molecular de $2,7 \times 10^6$ Da y un coeficiente de sedimentación de 35S (Forss y col., 1984, Robertson y col., 1985, La Torre y col., 1980). El extremo 5' no posee la secuencia CAP característica de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares y virales. Sin embargo, está covalentemente unido a una proteína de bajo peso molecular denominada VPg (Grubman, 1980, Sangar y col., 1977) codificada por el genoma viral por 3 genes en tándem (Forss y col., 1984). Esta proteína podría tener una función importante en la replicación viral en Picornavirus (Crawford y Baltimore, 1983).

El extremo 5' del ARN presenta una región no codificante de aproximadamente 1.300 nucleótidos de longitud. Se desconoce la función de la primeras 400 bases a partir del extremo 5'. A continuación se encuentra un tramo de policitidinas (poli C) cuya longitud oscila entre 100 y 200 bases (Rowlands y col., 1978). La función del poli C es desconocida, aunque se ha tratado de relacionar con la virulencia. Escarmis y colaboradores (1992), mostraron que la longitud del poli C aumenta en el VFA serotipo C luego de 100 pasajes en cultivo. Se ha demostrado que tramos de poli C mayores que 75 nucleótidos presentan ventajas replicativas en cultivos celulares (Rieder y col., 1993). Sin embargo, tramos de poli C de sólo 2 bases de longitud resultaron igualmente virulentos en ratones.

Hacia el extremo 3' del poli C se encuentra una región con varios tripletes AUG que no se traducen. En esta región se encuentra el sitio de unión al ribosoma (IRES) que presenta una extensa estructura secundaria (Belsham y Brangwyn, 1990, Kuhn y col., 1990). El inicio de la traducción en los Picornavirus es un proceso independiente del cap y la subunidad ribosomal se une directamente al sitio IRES. Mediante estudios de mutagénesis dirigida sobre esta región se demostró que algunas mutaciones puntuales pueden llevar al incremento de la traducción *in vivo* (Martínez-Salas y col., 1993).

A esta región no traducida sigue la región codificante que presenta un único marco de lectura abierto que codifica para una sola poliproteína. Esta es procesada a través de una serie de clivajes proteolíticos que dan origen a las proteínas virales estructurales y no estructurales.

El genoma se divide en cuatro regiones codificantes denominadas L, P1, P2 y P3 (Figura 3).

La región L, ubicada en el extremo 5', codifica para un polipéptido líder. La traducción del mensajero viral puede comenzar alternativamente en 2 codones de iniciación separados entre sí por 84 nucleótidos dando origen a una proteína de PM 23.000 (Lab) o a una proteína de PM 16.000 (Lb) que presentan la misma secuencia carboxilo terminal (Belsham, 1992). La proteína L tiene actividad proteolítica y se autocliva del extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside, entre una lisina y una glicina. No se detectaron diferencias en la funcionalidad de las dos formas L (Medina y col., 1993). Recientemente, variantes carentes de esta región codificante mostraron una replicación más lenta en células BHK-21 y menor virulencia en ratón lactante y bovinos (Mason y col., 1997).

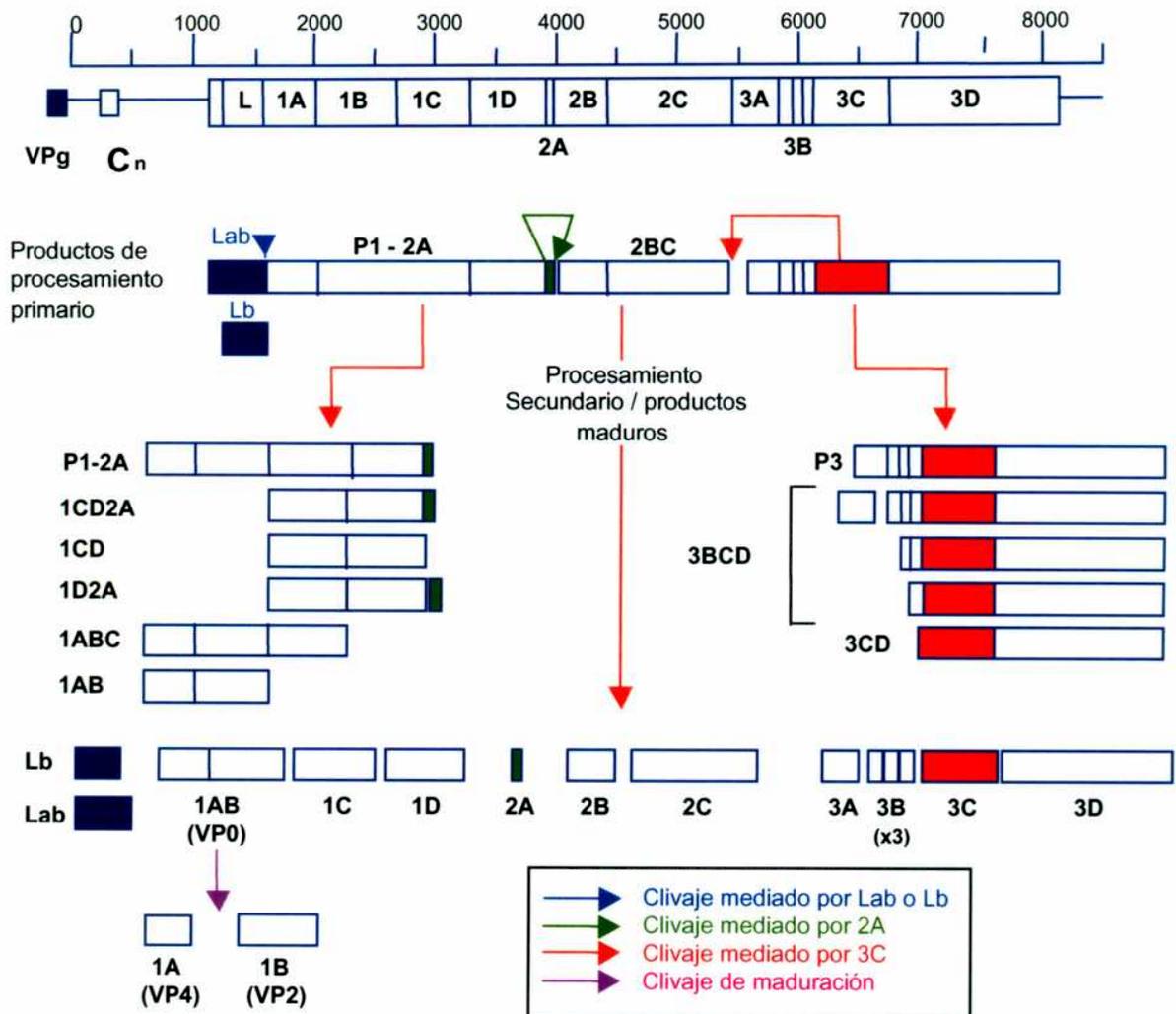
Hacia el extremo 3' de la región L se halla la región P1, que codifica para las cuatro proteínas estructurales en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1, que constituyen la cápside viral. Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales del virus y están involucradas en la replicación. La región P2 es clivada para dar los polipéptidos 2A, 2B y 2C. El polipéptido 2A está formado por 16 aminoácidos y tiene actividad proteolítica. Las funciones de las proteínas 2B y 2C no han sido aún dilucidadas. Existen evidencias que indican que 2C y el precursor 2BC forman parte del complejo de replicación. La proteína 2C estaría involucrada en la síntesis de ARN viral y su función sería semejante a la de una helicasa (Porter, 1993).

La región P3 codifica las proteínas 3A, 3B, 3C y 3D. A partir del precursor 3AB se originan las 3 moléculas de VPg. Esta proteína de 22 aminoácidos se une covalentemente vía tirosina al extremo 5' del ARN y a las cadenas nacientes y está probablemente involucrada en la iniciación de la síntesis de ARN. La proteína 3A contiene un dominio altamente hidrofóbico que constituiría una región involucrada en el anclaje a membrana.

La proteína 2C y el precursor 3AB se hallan fuertemente asociados. Se postula que 2C se une también a membranas vía 3AB. Este complejo, anclaría el ARN viral con el fin de proveer la organización espacial correcta y necesaria para su replicación (Porter, 1993).

La región 3C codifica para una proteasa cuya función es fundamental, pues es la enzima responsable de la mayoría de los clivajes relacionados con la maduración de la poliproteína precursora (Porter, 1993). La región 3D codifica para la polimerasa viral, que es una ARN polimerasa ARN dependiente. A esta proteína se la denomina también antígeno VIAA (antígeno asociado a la infección viral) (Robertson y col., 1983, Grubman y Baxt, 1982, Klump y col., 1984).

Figura 3: Estructura del genoma del VFA y procesamiento de la poliproteína del VFA



El clivaje mediado por Lab o Lb se señala en celeste, el mediado por 2A se señala en verde, el mediado por 3C se señala en rojo y el clivaje que ocurre en la encapsidación del ARN viral se señala en rosa.

En el extremo 3' del ARN viral se encuentra un tramo de poli adeninas (poli A) que varía entre 40 y 100 nucleótidos (Porter y col., 1978, Chartejee y col., 1976).

En el procesamiento de la poliproteína viral intervienen al menos 3 proteasas víricas: la proteasa 3C, que interviene en procesamiento de P1, P2 y P3, la proteasa 2A, que

cataliza el clivaje entre 2A y 2B y la proteasa L, que autocataliza su separación de la poliproteína (Ryan y col., 1989).

2.3 Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación viral tiene una duración que varía entre 5 y 10 horas, dependiendo de la cepa viral, el hospedador y de variables dependientes del ambiente (temperatura, pH, estado nutricional de las células, etc) (Baltimore y col., 1966).

La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción del virus a la membrana plasmática de la célula hospedadora. Es un proceso reversible y su etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, resultando necesaria la presencia de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Brown y col., 1962). Esta etapa es de particular importancia, ya que representa un importante determinante de la susceptibilidad celular a la infección y cumple un rol importante en el tropismo y la patogenia del virus (Crowell y Landau, 1979). Debido a que el tratamiento con tripsina provoca la inactivación del VFA y su sitio de clivaje se encuentra en VP1, ésta proteína viral es la involucrada en la unión al receptor celular (Cavanagh y col., 1978). Se ha propuesto que la zona de interacción del virus con el o los receptores celulares es la secuencia aminoacídica RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) del *loop* G-H de dicha proteína (Baxt y Becker, 1990). Esta secuencia se encuentra altamente conservada en los distintos serotipos del VFA y expuesta en la superficie del virión (Logan y col., 1993). Se ha descrito que péptidos que contienen esta secuencia son capaces de inhibir la unión del VFA a las células susceptibles (Fox y col., 1989).

El receptor celular para el VFA es una integrina y es común al de la vitronectina, aunque no se descarta que el virus utilice otros receptores celulares (Beristein y col., 1995). Además, se demostró que algunas cepas de VFA de serotipo O adaptadas a cultivo de células requieren un contacto directo con heparán sulfato en la superficie celular para una infección eficiente (Jackson y col., 1996).

El mecanismo propuesto para la entrada del genoma viral es la endocitosis mediada por receptor. Se demostró que el pH ácido de los endosomas proporciona el medio adecuado para la ruptura del virus en subunidades 12S, dejando el ARN viral libre para iniciar la replicación (Carrillo y col., 1984, Carrillo, 1985)

La replicación del genoma se produce en el citoplasma utilizando la ARN polimerasa ARN dependiente 3D, codificada por el virus. Esta polimerasa sintetiza cadenas complementarias de polaridad negativa que constituyen el templado de las cadenas de

polaridad positiva (Sangar, 1979). De estas cadenas, algunas sirven como templado para amplificar el genoma viral y carecen de proteína VPg (Nomoto y col., 1976). Las otras cadenas de polaridad positiva son empaquetadas en cápsides para formar viriones. Durante el proceso de replicación se forma un intermediario de ARN doble cadena asociado al retículo endoplásmico liso. La entrada de la molécula de ARN a la procápside (partícula vacía 70S) resulta en la aparición del provirión que protege al ácido nucleico de la degradación de nucleasas (Fernández Tomas y Baltimore, 1973). La formación del virión maduro ocurre con el clivaje de VP0 en VP4 y VP2, lo cual lleva al reordenamiento estructural de la cápside viral que incrementa su estabilidad y constituye el último paso en la maduración de la partícula viral (Rueckert, 1976). La formación de los viriones maduros lleva a la lisis celular, con la cual son liberados al medio para iniciar un nuevo ciclo.

Tempranamente luego de la infección, el VFA produce la inhibición de la síntesis de los ARN mensajeros celulares interviniendo en el inicio de la transcripción. La proteína responsable de este fenómeno es la proteasa 3C que, además, degrada la histona H3 (Falk y col., 1990). La infección viral también inhibe la síntesis de proteínas celulares mediante la proteasa viral L, que interviene en la degradación del factor celular p220 implicado en el proceso de iniciación de la traducción (Devanney y col., 1988). El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante (Forss y col., 1984). Este precursor no se detecta pues se cliva durante su traducción, dando origen a las 4 proteínas precursoras P0 (L/L'), P1 (1ABCD-2A), P2 (2BC) y P3 (ABCD). Estas, a través de clivajes secundarios mediados por proteasas virales, generan las proteínas estructurales y no estructurales presentes en células infectadas.

El último evento en el procesamiento es el clivaje del precursor VP0 en VP2 y VP4. Este proceso ocurre en los picornavirus después del ensamblado de la cápside y está asociado con la encapsidación del ARN viral y con la adquisición de infectividad del provirión.

3. Variabilidad genética del VFA

3.1 Mecanismos de generación de variabilidad genética en los virus a ARN

Los virus cuyo genoma esta compuesto por ARN constituyen el grupo de parásitos más abundante de animales y plantas. Estos organismos comparten con sus hospedadores el gran potencial de variación pero difieren de ellos en su tolerancia a dichas modificaciones. Existen importantes restricciones que limitan la variación del ADN celular ya que la alta

complejidad genética de las células necesita de una alta fidelidad en la replicación del material genético que será transmitido a las generaciones siguientes. Para una determinada complejidad genómica, existe una fidelidad crítica de replicación del material genético debajo de la cual dicha información no puede mantenerse. Es de esperar que las polimerasas con actividad de *proofreading*, capaces de corregir los nucleótidos mal incorporados en el ADN, hayan evolucionado junto con el aumento en el tamaño del ADN que es necesario para la organización celular (Eigen y Schuster, 1979). La tasa de mutación puntual del ADN celular se estiman entre 10^{-8} y 10^{-11} sustituciones por nucleótido por ronda de replicación (Fry y Loeb, 1986) debido a la actividad correctora de las ADN polimerasas y al alto poder de selección de nucleótidos correctos que poseen. Cuando se suprime la actividad reparadora de las ADN polimerasas, la tasa de mutación alcanza 10^{-4} sustituciones por nucleótido por ronda de replicación (Eigen y Schuster, 1979, Fry y Loeb, 1986, Loeb y Kunkel, 1982).

Las ARN polimerasas ARN dependientes carecen de la actividad exonucleasa 3'→5' asociada con la actividad de *proofreading*, por lo que la tasa de mutación promedio en la replicación de los genomas a ARN y en la retrotranscripción varía entre 10^{-3} y 10^{-5} por nucleótido y por ronda de replicación (Domingo y Holland, 1988, 1994). Los genomas de los virus a ARN son pequeños (3 a 30 Kb.) lo que los hace compatibles con una baja fidelidad en la copia de la información genética. Sin embargo, mayores frecuencias de mutación podrían llevar a la pérdida de la información genética, lo que indica que la frecuencia de mutación de las polimerasas virales esta muy cerca del máximo que puede tolerarse (Holland y col., 1992).

Otro mecanismo que contribuye a la alta variabilidad genética de los virus a ARN es la recombinación genética que consiste en la unión covalente de dos ARN provenientes de moléculas parentales distintas (King, 1988). La primera prueba directa de recombinación genética en virus a ARN fue obtenida con el VFA (King y col., 1982). Existen varios sitios de recombinación en el genoma del VFA pero no existe evidencia de que sean eventos específicos de sitio (King y col., 1985). La recombinación de genomas de VFA ocurre con menor frecuencia en virus menos relacionados (pertenecientes a distintos serotipos). No se conoce la contribución de este mecanismo en la evolución del VFA.

Una consecuencia de la alta tasa de mutación que opera durante la replicación del ARN es que constantemente se generan genomas mutantes (Domingo y col., 1978). La mayoría se mantienen en bajas frecuencias y algunas son eliminadas. Así, los genomas a ARN son altamente heterogéneos, lo que los provee de una alta capacidad de adaptación.

3.2 Las poblaciones de VFA son cuasiespecies

Las poblaciones de ARN no son genéticamente definidas. Eigen y colaboradores (1979, 1988) utilizaron el término cuasiespecies para describir la distribución compleja de genomas relacionados, no idénticos que constituyen una población de ARN. Esta distribución incluye una o algunas secuencias maestras y un espectro de secuencias mutantes. La secuencia maestra, en general, coincide con la secuencia promedio o consenso y puede representar una proporción muy pequeña del número total de genomas, que fue estimada en un 10 % para el fago Q β (Domingo y col., 1978) y es menor al 1 % para el VFA (Sobrinó y col., 1983). Así, la mayoría de las moléculas pertenecen al espectro de mutantes y constituyen un enorme reservorio de variantes genéticas y fenotípicas.

La situación en la cual un espectro dinámico de mutantes produce la misma secuencia consenso se denomina equilibrio de las poblaciones de ARN (Domingo y Holland, 1988). Durante la replicación del ARN se generan genomas mutantes en forma continua. La proporción que cada mutante adquiera en una población es un resultado no sólo de la tasa de aparición de la mutación sino de la capacidad competitiva de la mutante frente a las otras variantes (habilidad para replicar el genoma, para formar la cápside, etc). De esta forma, una variante será mantenida en baja frecuencia a pesar de que se genere a una tasa alta. Se han identificado 3 mecanismos que actúan modificando las cuasiespecies virales y promueven la evolución viral: 1) la acción modulativa de la presión negativa por la cual una nueva variante es favorecida o no en la población según su aptitud respecto a las otras variantes, 2) la acción de la selección positiva que hace que una variante neutral o de baja aptitud se vuelva dominante en respuesta a un cambio ambiental (las mutantes que escapan a la neutralización son un ejemplo) y 3) eventos al azar que hacen que una variante sea amplificadas respecto de las demás independientemente de su aptitud competitiva (Domingo y Holland, 1994).

La diversidad genética del VFA se alcanza no sólo por la fijación de mutaciones. Un animal infectado genera genomas variantes que tienen una cierta probabilidad de ser transmitidos a nuevos hospedadores y se pueden establecer infecciones productivas por amplificación de genomas diferentes de la secuencia consenso o maestra. Esta situación puede ocurrir dentro de un único hospedador donde unos pocos viriones invaden nuevos tejidos u órganos.

3.3 Heterogeneidad genética del VFA

La variabilidad genética del VFA ha sido ampliamente estudiada. Se ha determinado que la homología de secuencia entre ARN de los serotipos A, O y C es del 44-70% y para virus de distintos subtipos dentro de los serotipo A y O la homología supera el 70%. El ARN genómico de virus aislados durante un único brote de VFA difirieron en 0,7-2,2% de los nucleótidos (Domingo y col., 1980, Anderson y col., 1985). El análisis de ARN de placas virales individuales derivadas de un aislamiento revelaron la presencia de 2 diferentes secuencias nucleotídicas.

Mediante la comparación de la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 de 22 aislamientos de los serotipos A, O y C se construyeron árboles filogenéticos que mostraron que los aislamientos tenían secuencias similares pero no idénticas, que se podían agrupar de acuerdo al serotipo (Dopazo y col., 1988). Los resultados mostraron que se permite una considerable variación alrededor de la secuencia consenso que define un serotipo, pero existen restricciones más severas entre serotipos. La variabilidad observada para el serotipo A fue mayor que las observadas para los serotipos O y C.

Villaverde y colaboradores (1988, 1991) compararon las tasas de fijación de las mutaciones en la proteína VP1 y en la polimerasa 3D entre aislamientos de VFA epidemiológicamente relacionados y observaron que la tasa de fijación de mutaciones en VP1 era 2,1 veces mayor que la de la proteína 3D. Sin embargo, la heterogeneidad genética de los segmentos de ARN codificantes para VP1 y 3D era similar, lo cual sugiere que la conservación del gen de la polimerasa no se debe a una mutabilidad menor cuando la polimerasa copia ese segmento, sino a una continua selección de la misma secuencia consenso.

Mediante pasajes seriados en cultivo de células fue posible estimar la diversidad genética entre poblaciones de VFA y dentro de una misma población (Sobrinó y col., 1983). La secuencia nucleotídica promedio del ARN de las poblaciones difería en 14-57 nucleótidos. El análisis de clones independientes de dos poblaciones mostró que cada molécula de ARN difería de la secuencia parental en 2-8 sustituciones por genoma.

Al analizar virus recuperados de infecciones persistentes en cultivo de células se observó una modificación gradual de sus genomas y de diversas características fenotípicas (De la Torre y col., 1985, Díez y col., 1990). También se observó la selección de virus variantes luego de una única infección en células BHK-21 parcialmente resistentes (Escarmis y col., 1998). Los virus recuperados secuencialmente de animales persistentemente infectados mostraron cambios en la carga de sus proteínas estructurales, cambios en la secuencia

de las proteínas y cambios en la antigenicidad (Gebauer y col., 1988). La aplicación de un inmunoensayo *in situ* (Diez y col., 1989) reveló que un clón de VFA pasado en cultivo de células era antigénicamente heterogéneo.

Se han seleccionado variantes antigénicas de VFA en diferentes condiciones: en animales infectados naturalmente (Feigelstock y col., 1996, Feigelstock y col., 1992, Mateu y col., 1994), en animales parcialmente inmunes (Fagg y Hyslop, 1966), en animales persistentemente infectados (Gebauer y col., 1988), en células persistentemente infectadas (De la Torre y col., 1985, Diez y col., 1990) y en cultivos de células en ausencia o presencia de presión inmune (Borrego y col., 1993, Sevilla y col., 1996, Mbayed y col., 1997, Schiappacassi y col., 1995). Además, el potencial de variabilidad se demostró por la facilidad con la que se seleccionan variantes de VFA resistentes a la neutralización con anticuerpos monoclonales (AcM). Estos resultados mostraron que la selección de variantes antigénicas del VFA no resulta necesariamente de la presión inmune. Existen dos modelos para explicar la aparición de variantes antigénicas en ausencia de presión inmune: 1) las variantes aparecerían por fuerzas selectivas distintas de la presión inmune pero los reemplazos podrían contribuir a la variación antigénica, 2) los sitios antigénicos estarían sujetos a menores restricciones estructurales y serían más tolerantes a las sustituciones aminoacídicas que otras regiones protéicas (Domingo y col., 1993).

4. Diversidad antigénica del VFA

4.1 Antigenicidad

El VFA es un virus antigénicamente muy diverso y heterogéneo. Las primeras observaciones al respecto se basaron en el reconocimiento de varios tipos. Se identificaron 7 serotipos distintos utilizando la prueba de fijación de complemento: los serotipos A y O fueron identificados por Vallé y Carré, (1922), el serotipo C por Waldmann y Trautwein (1926) y, posteriormente, se identificaron los serotipos Sat1, Sat 2, Sat 3 y Asia 1 (Brooksby y Rogers, 1957, Brooksby, 1958). Los animales recuperados de la infección provocada por un virus de un serotipo o vacunados contra un serotipo son susceptibles a la infección por un VFA perteneciente a otro serotipo.

Se han identificado más de 65 subtipos virales con diferentes grados de relación serológica (Pereira, 1977) y múltiples variantes antigénicas (Mateu y col., 1988). En concordancia con la estructura de cuasiespecies del VFA (Domingo y col., 1992), se sugiere que cada aislamiento viral puede ser único en su composición fina de epitopes y

puede incluir múltiples variantes genéticas y antigénicas (Domingo y col., 1980, Mateu y col., 1989).

El serotipo Asia 1 se encuentra distribuido en el continente asiático, los serotipos Sat en el continente africano y los serotipos A, O y C en Sudamérica, Europa, Asia y Africa.

4.2 Los sitios antigénicos en los diferentes serotipos

La determinación de la estructura tridimensional de la cápside del VFA de los serotipos O y C por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado ha permitido interpretar propiedades biológicas del virus como la antigenicidad y también entender los mecanismos de variación antigénica y sus restricciones estructurales (Acharya y col., 1989, Fox y col., 1987, Lea y col., 1994).

La secuenciación de variantes virales que escapan a la neutralización con AcM y los resultados obtenidos en ensayos de competencia entre VFA y péptidos sintéticos que imitan segmentos de la partícula viral han permitido la identificación de los sitios antigénicos del VFA en los serotipos A (Baxt y col., 1989, Saiz y col., 1991, Thomas y col., 1988), O (Xie y col., 1987, Parry y col., 1989, Kitson y col., 1990,) y C (Mateu y col., 1989, Mateu y col., 1990, Lea y col., 1994). Estos sitios antigénicos se encuentran distribuidos en las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (Figura 4).

El sitio antigénico A (Strohmaier y col., 1982) se encuentra en el *loop* G-H de la proteína VP1 (posición 140-160) que se presenta como una región protruyente y desordenada (Acharya y col., 1989, Lea y col., 1994). Este sitio antigénico incluye múltiples epitopes continuos y solapados (Mateu y col., 1990). Existen múltiples evidencias que sugieren que el sitio A es el sitio inmunodominante del VFA: el clivaje de la cápside viral en el sitio A o C disminuye drásticamente la antigenicidad de la partícula viral (Wild y col., 1970); péptidos sintéticos que representan el sitio A absorben la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de animales (Pffaf y col., 1982); estos péptidos sintéticos son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en animales (Pffaf y col., 1982, Bittle y col., 1982), y AcM neutralizantes generados contra VFA se dirigen al sitio antigénico A (Mateu y col., 1987, 1989 y 1990). El sitio antigénico A es la zona más variable de la cápside viral y se le atribuye la extensa heterogeneidad antigénica del VFA (Mateu y col., 1988).

En el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 se localiza el sitio antigénico C (aminoácidos 200-213). En el serotipo O, el sitio antigénico C forma con el sitio A un

dominio antigénico discontinuo llamado sitio I (Kitson y col., 1990). En el serotipo C, los sitios A y C aparecen como sitios antigénicos continuos e independientes.

El sitio antigénico D, definido para el serotipo C, incluye el *loop* B-C de la proteína VP2 (residuos 70 a 80) y el *knob* B-B de VP3 (residuos 58 a 61) que corresponden a los sitios antigénicos II y IV definidos para el serotipo O. En el serotipo C participa del sitio D parte de la región carboxilo terminal de VP1, alrededor del aminoácido de la posición 193. El *loop* E-F de la proteína VP2 (residuos 131 al 134) participa en el serotipo O, del sitio antigénico II.

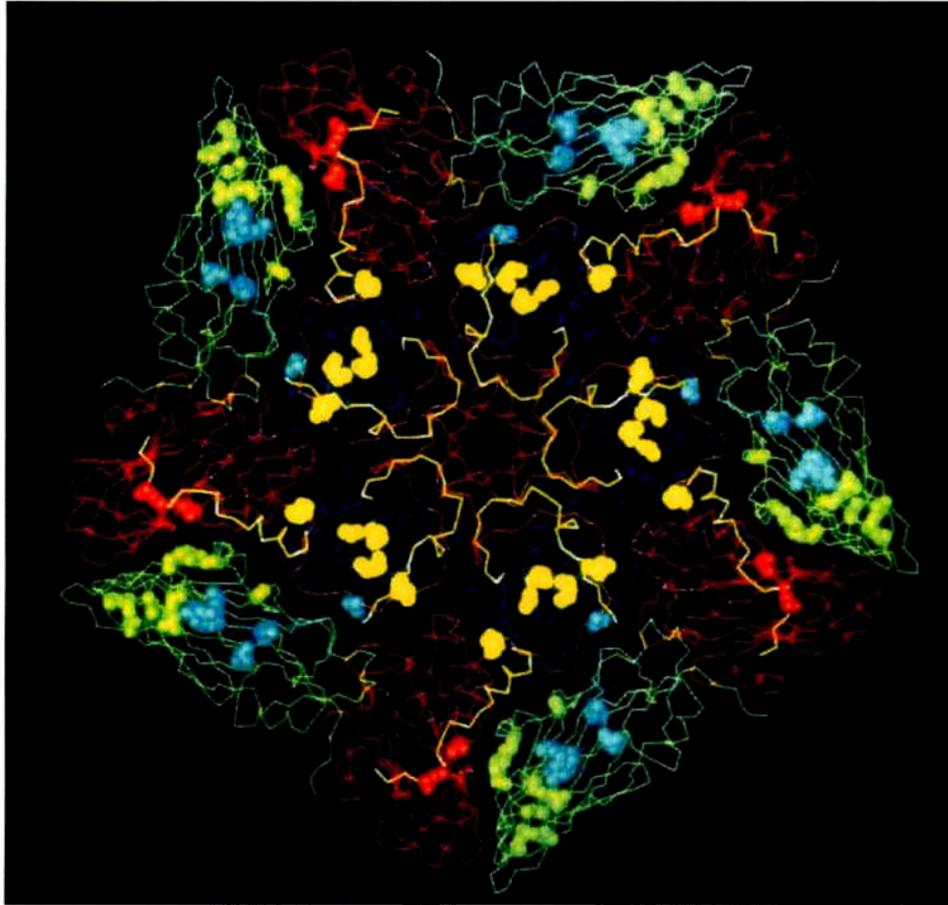
En el serotipo O se ha identificado un sitio antigénico independiente, el sitio antigénico III, en el *loop* B-C de la proteína VP1 (residuos 43 al 48). Se ha descrito la existencia de un quinto sitio antigénico para el serotipo O (Crowther y col., 1993), que se localiza en el *loop* G-H de la proteína VP1. Este sitio presenta independencia funcional del sitio I pero se solapa físicamente.

Se ha demostrado la importancia de sustituciones aminoacídicas en sitios antigénicos distintos del sitio A y C en la diversificación antigénica del VFA en el campo (Feigelstock y col., 1992).

4.3 Variabilidad en los sitios antigénicos

Los cambios moleculares responsables de la variación antigénica deben preservar una cápside funcional. El virión debe permanecer estable y mantener su capacidad de infectar células susceptibles por unión al receptor celular, a la vez que debe tratar de escapar al sistema inmune. En algunos miembros de la familia *Picornaviridae* se propone que los residuos involucrados en la unión al receptor se encuentran ubicados en un bolsillo o depresión, inaccesibles a los anticuerpos (Colonno y col., 1988).

Sin embargo, el VFA tiene una superficie que no presenta ninguna depresión donde los residuos responsables de la unión al receptor puedan ocultarse. Por el contrario, la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) se localiza en la punta de un *loop* altamente expuesto, flexible y accesible a los anticuerpos. De esta forma, el triplete RGD, altamente conservado, se encuentra flanqueado por dos regiones hipervariables que servirían para "distraer" al sistema inmune y preservar estos residuos (Acharya y col., 1989, Lea y col., 1994). Estas observaciones podrían sugerir que la importancia de la secuencia RGD sería principalmente funcional y no antigénica.

Figura 4: Sitios antigénicos en la unidad pentamérica del VFA O1K

En azul se muestran los residuos de VP1, en verde los de VP2, en rojo los de VP3 y en amarillo los de VP4. Las esferas color celeste situadas en la superficie del virión corresponden a los aminoácidos 133-158 de la proteína VP1 (Acharya y col., 1989).

Debido a que la respuesta inmune humoral constituye la defensa principal contra el VFA, es importante la existencia de zonas de la cápside que sean capaces de cambiar antigénicamente por sustituciones en los residuos de contacto con los anticuerpos o mediante cambios conformacionales. El *loop* G-H de la proteína VP1 es la región más variable del virus. Es una estructura altamente flexible, desordenada y móvil que ofrece bajas restricciones conformacionales y permite una alta tolerancia en las sustituciones

aminoacídicas. La conservación de esta flexibilidad resulta altamente ventajosa para el virus y facilita el escape al reconocimiento por anticuerpos.

El sitio antigénico D es discontinuo e involucra residuos expuestos de las proteínas VP1, VP2 y VP3. Este sitio es un ejemplo de las restricciones estructurales que limitan la fijación de cambios aminoacídicos en epitopes del VFA, ya que las sustituciones en este sitio encontradas en las mutantes que escapan a la neutralización ocurren repetidamente y en eventos independientes en unos pocos residuos expuestos que no están involucrados en interacciones con otros aminoácidos de la cápside. Las sustituciones aminoacídicas en el sitio D presentes en aislamientos naturales ocurren en las mismas posiciones reemplazadas en las mutantes de escape a la neutralización (Mateu y col., 1994). Además, en VFA pasado en cultivo de células en ausencia de presión inmune, las sustituciones aminoacídicas ocurren con menor frecuencia en el sitio D que en el sitio A (Diez y col., 1989, Domingo y col., 1993). Se ha propuesto que el sitio D sería altamente intolerante a cambios aminoacídicos debido a restricciones estructurales (Lea y col., 1994), es decir que los diferentes sitios antigénicos y epitopes del VFA difieren en su tolerancia a reemplazos aminoacídicos.

4.4 Bases moleculares de la variabilidad genética

Mediante la secuenciación de cepas virales y la caracterización de las mismas con un panel de AcM bien caracterizados, ha sido posible comprender las bases moleculares de la variabilidad antigénica observada en el VFA. Esta variabilidad se genera por cambios aminoacídicos en los epitopes involucrados en la neutralización viral. La heterogeneidad antigénica se ha detectado no sólo entre virus aislados en lugares y tiempos distantes sino también en virus relacionados epidemiológicamente. Además, se han observado diferencias antigénicas entre virus provenientes de diferentes lugares en la misma fecha, así como también entre virus colectados a partir de un mismo brote (Mateu y col., 1988). Todos estos resultados sugieren que cada aislamiento viral es genética y antigénicamente único.

Se han descrito dos mecanismos de variación antigénica en el sitio antigénico A (Martínez y col., 1991). Uno de ellos involucra modificaciones graduales de los epitopes debido a la acumulación de sustituciones aminoacídicas; el otro consiste en cambios antigénicos abruptos causados por sustituciones aminoacídicas únicas en posiciones críticas. El cálculo de los índices de variabilidad para cada aminoácido del sitio A mostró la existencia de dos regiones hipervariables flanqueando la región RGDLA (arginina-

glicina-ácido aspártico-leucina-alanina) altamente conservada y que incluye la región RGD involucrada en el reconocimiento del virus con la célula blanco. Sustituciones en las regiones hipervariables causan una modificación gradual de los epitopes. En cambio, sustituciones en las posiciones 145 o 146 de la proteína VP1 del VFA del serotipo C son suficientes para disminuir o anular la reactividad de un panel de AcM que reconocen distintos epitopes dentro del sitio A (Mateu y col., 1990, Martínez y col., 1991). Se reportó que para el serotipo A las sustituciones más frecuentemente encontradas en mutantes resistentes a AcM ocurrieron en la posición 150, equivalente a la posición 146 en el serotipo C (Bolwell y col., 1989). A partir de bovinos persistentemente infectados con C3 Resende se recuperaron variantes con un cambio en la posición 148 que afectó la mayoría de los epitopes del sitio antigénico A (Gebauer y col., 1988).

Todos estos datos indican que algunas modificaciones genéticas muy limitadas pueden tener un efecto muy importante en la antigenicidad del VFA, afectando múltiples epitopes. El sitio antigénico C muestra una conservación mayor que el sitio A, tanto en la secuencia aminoacídica como a la reactividad con AcM. En virus del serotipo C se ha encontrado que algunas sustituciones en las posiciones 200 y 202 de la proteína VP1 resultan en un cambio de reactividad con los AcM disponibles contra ese sitio antigénico (Martínez y col., 1991).

El sitio antigénico D presenta una heterogeneidad antigénica semejante a la del sitio A, a pesar de que el sitio A se compone de epitopes continuos en tanto que el sitio D se compone de epitopes discontinuos en la interfase de 3 proteínas. En este sitio antigénico, las posiciones 74 de la proteína VP2, 58 de la proteína VP3 y 193 de la proteína VP1 parecen tener un rol clave en el reconocimiento antigénico. Se encontraron mutaciones en estas posiciones en cepas de campo provenientes de animales infectados (Feigelstock y col., 1996), como también en mutantes de escape aisladas a partir de VFA del serotipo C (Lea y col., 1994), O (Kitson y col., 1990) y A (Saiz y col., 1991).

Cada sitio antigénico identificado en el VFA es relevante en el reconocimiento del virus por el sistema inmune del animal susceptible y participa, en diferentes grados, en la variación antigénica del virus en la naturaleza. La hipervariabilidad del sitio A refleja, no sólo la selección ejercida por el sistema inmune, sino también la tolerancia de sustituciones fijadas independientemente de la presión inmune (Borrego y col., 1993, Diez y col., 1989). En cambio, el sitio antigénico D muestra sustituciones aminoacídicas más limitadas en número y tipo que el sitio A, tanto en aislamientos naturales (Mateu y col.,

1994) como en virus obtenido luego de pasajes seriados de VFA C-S8cl en células en cultivo (Holguin y col., 1997)

5. Respuesta inmune frente al VFA

La respuesta inmune producida en un organismo frente a un agente infeccioso combina distintos mecanismos dirigidos a la eliminación del patógeno.

La importancia de la respuesta inmune humoral en la protección contra el VFA ha sido ampliamente documentada (Van Bekkum, 1969, Pay y Hingley, 1987) e indica que los anticuerpos circulantes juegan un papel muy importante en la protección *in vivo* frente a la infección, existiendo en general una buena correlación entre niveles altos de anticuerpos neutralizantes determinados en ensayos *in vitro* y protección frente a la infección natural o el desafío. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la existencia de altos niveles de anticuerpos no es suficiente para la protección: en las pruebas de potencia para evaluar las vacunas contra VFA, animales vacunados con niveles de anticuerpos neutralizantes bajos o no detectables resultan protegidos frente al desafío viral, en tanto que algunos animales con altos títulos de anticuerpos neutralizantes resultan susceptibles (Collen, 1994). Además, cuando se inoculan péptidos sintéticos que imitan un epítopo localizado en el extremo carboxilo terminal de VP1, se producen altos niveles de anticuerpos neutralizantes pero escasa protección (Meloan y Barteling, 1986). Los títulos de anticuerpos medidos *in vitro* por ensayos de seroneutralización o ELISA permiten determinar la capacidad de los anticuerpos de interactuar con el virus o de interferir con la infección de células en cultivo, pero no evalúan otros mecanismos dependientes de anticuerpos que pueden estar involucrados en la protección frente al VFA. En experimentos de protección pasiva de ratones se demostró que la porción Fc de los anticuerpos era necesaria para la protección. Resultados semejantes se obtuvieron utilizando AcM en los que la eliminación de la porción Fc o la inhibición de la fagocitosis anulaban la acción protectora de los AcM *in vivo* (Mc Cullough y col., 1986). Estos resultados sugieren que la opsonización de las partículas virales y la destrucción de los complejos antígeno-anticuerpo por las células del complejo retículoendotelial vía el receptor para Fc puede tener importancia en la protección contra el VFA (Mc Cullough y col., 1986, Mc Cullough y col., 1988).

Hasta el momento existe una extensa caracterización de la respuesta inmune humoral contra el VFA, pero el rol de la respuesta celular no está muy claro. Se ha demostrado

que la respuesta inmune frente al VFA es T dependiente en ratones (Collen y col., 1989) y en bovinos (Collen y Doel, 1990). En particular, estas células juegan un importante papel en el establecimiento de la memoria inmunológica (Piatti y col., 1991).

5.1 Respuesta inmune humoral

La infección de animales susceptibles con VFA causa un aumento muy rápido en los anticuerpos séricos que puede detectarse a los 4 días luego de la infección. Esta respuesta es básicamente de IgM y alcanza un pico a los 10-14 días después de la infección. En general, la respuesta de IgM cae a niveles basales dentro de los 30-40 días, aunque algunos animales muestran altos niveles de IgM después de 80 días. El cambio de isotipo ocurre dentro de los 4 y 7 días posteriores a la infección y resulta en una respuesta predominantemente de IgG1 con niveles detectables de IgG2 e IgGA. El aumento en los niveles de IgG1 coincide con la resolución de las lesiones, la terminación de la viremia y la reducción de la excreción de virus. Los niveles de IgG alcanzan un pico a los 14-28 días y la protección al desafío con el virus homólogo dura 1 año y medio o más (Collen, 1994).

Con respecto a la respuesta inmune a nivel de mucosas, se ha descrito un pico de actividad neutralizante en los fluidos faríngeos de animales infectados con VFA. Esta actividad neutralizante se observó en la fase inflamatoria de la enfermedad (7 días luego de la infección) y se atribuyó a IgM e IgA. Sin embargo, es difícil analizar la contribución de la inmunidad de mucosas en la protección contra el VFA debido a los altos títulos de anticuerpos en el suero que pueden llegar a las mucosas a través de los tejidos dañados y ser responsables de prevenir la replicación viral (Francis y col., 1983).

En animales vacunados con virus inactivado la respuesta inmune se caracteriza por un aumento muy rápido de IgM, IgG1 e IgG2. La primera inmunoglobulina que se produce es la IgM, cuyo pico se observa de los 10 a los 14 días posteriores a la vacunación y luego declina rápidamente. El pico de IgG se observa unos días más tarde (de 14 a 28 días post infección) siendo, en general, el pico de IgG1 mayor que el de IgG2. Generalmente, los niveles de anticuerpos neutralizantes y la afinidad promedio de la respuesta inducida por la vacunación son menores que los inducidos por una infección natural (Collen, 1994).

La respuesta inmune en mucosas debida a la vacunación es muy distinta a la que se observa en la infección, y la inducción de IgA secretoria parece estar muy influenciada por el tipo de vacuna que se utilice y los intervalos en que se vacune (Francis y col., 1983).

En bovinos, los niveles de anticuerpos se mantienen durante meses y van descendiendo lentamente. Los anticuerpos del suero de animales infectados reconocen mayoritariamente la proteína VP1, en menor grado VP2 y VP3 y no reconocen la proteína VP4, ya que no se encuentra expuesta en la superficie del virión.

Existen evidencias que indican que la subclase de IgG producida es importante en los niveles de protección alcanzados. En bovinos infectados y vacunados con virus inactivado se monta una respuesta humoral en la que los niveles de IgG1 son predominantes sobre los de IgG2. En algunos animales infectados se observó una respuesta temprana con mayores niveles de IgG2 que de IgG1, pero la resolución de las lesiones sólo se observó cuando los niveles de IgG1 aumentaron (Mulcahy y col., 1990). En cambio, en animales inmunizados con péptidos sintéticos se observaron relaciones IgG1/IgG2 significativamente menores que aquellas observadas en animales inmunizados con vacuna a virus inactivado. También se observaron diferencias de isotipo en la respuesta inmune inducida en ratones infectados con VFA o inmunizados con vacunas a virus inactivado formuladas en adyuvante acuoso u oleoso (Perez Filgueira y col., 1995). Además, los niveles de protección alcanzados por vacunas contra el VFA producidas en células BHK-21 crecidas en suspensión o epitelio lingual bovino correlacionaron con la capacidad de cada preparación de inducir mayores niveles de IgG1 (Capozzo y col., 1997).

Se ha reportado que la IgG1 bovina es más eficiente que la IgG2 para fijar complemento *in vitro* y presenta una mejor capacidad para interactuar con los receptores Fc de los fagocitos y promover la opsonización y posterior fagocitosis de los complejos antígeno-anticuerpo por las células del sistema retículoendotelial (McGuire y col., 1979).

La respuesta inmune humoral neutralizante que se despierta tanto en animales infectados como vacunados es serotipo específica. Sin embargo, los anticuerpos totales presentan, en ambos casos, una reactividad heterotípica (Collen y col., 1998).

El título de anticuerpos inducido en los animales infectados es de mayor magnitud pero menor duración que en los animales vacunados, lo cual probablemente refleja el efecto de los adyuvantes presentes en las vacunas (García –Valcarcel y col., 1998).

5.2 Respuesta inmune celular

La inducción de una respuesta inmune contra un antígeno necesita de la activación de linfocitos T cooperadores específicos contra dicho antígeno. Estos linfocitos T activados son necesarios para estimular el crecimiento y diferenciación de linfocitos B y para la

activación de linfocitos T citotóxicos. El reconocimiento de los antígenos virales por los linfocitos T requiere de la presentación del antígeno procesado en forma de péptidos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Así se produce la activación de los linfocitos T específicos que proliferan y secretan citoquinas.

La respuesta inmune frente al VFA en ratones infectados es dependiente de células T (Collen y col., 1989) y está restringida por moléculas del CMH (Francis y col., 1987), ya que la adición de epitopes para células T no específicos a un péptido sintético de VFA permitió la inducción de una respuesta inmune neutralizante en ratones no respondedores, respuesta que no se inducía en ausencia de estos epitopes T.

Los estudios acerca del rol de la células T en la respuesta inmune de bovinos frente al VFA sugieren que ésta es T dependiente (Collen y Doel, 1990) y se han abocado especialmente a la respuesta T cooperadora y a la identificación de epitopes para células T en las proteínas estructurales del VFA. Estos estudios se llevaron a cabo en animales vacunados con virus inactivado o con péptidos sintéticos.

La respuesta de células T es heterotípica, ya que los linfocitos provenientes de animales infectados o vacunados con una cepa de VFA son capaces de proliferar en respuesta a otra cepas virales (Collen y Doel, 1990, Collen y col., 1998). La magnitud de la respuesta frente a virus heterólogo es menor que la observada frente al virus homólogo y varía de animal a animal y con el serotipo utilizado en la inmunización (García –Valcarcel y col., 1998).

Mediante ensayos de proliferación con las proteínas virales estructurales aisladas se mostró que VP1, VP2 y VP3 son capaces de inducir proliferación en linfocitos de animales vacunados, indicando que contienen epitopes capaces de activar linfocitos T. La proteína VP3 y el precursor VP0 fueron capaces de inducir una respuesta heterotípica (activar linfocitos de animales vacunados con VFA de serotipos distintos)(Collen y Doel, 1990, Collen y col., 1998). La respuesta contra VP1 fue serotipo específica indicando que la respuesta heterotípica que se observa frente al virus entero puede ser atribuida a proteínas distintas de VP1.

Si bien la protección inducida por la vacunación es de corta duración, es posible detectar linfocitos de memoria hasta 20 meses post vacunación (Collen y Doel, 1990).

Collen y colaboradores (1991) estudiaron la capacidad de péptidos sintéticos correspondientes a diferentes regiones de VP1 de estimular células T provenientes de bovinos vacunados con virus inactivado e identificaron un epítipo inmunodominante para células T situado entre los residuos 21 y 40 de la proteína VP1. La respuesta inducida era

de tipo T cooperadora. También se ha descrito la presencia de epitopes para células T en la regiones 54 a 72 de la proteína VP2 y 99 a 110 de la proteína VP3.

Mediante inmunizaciones de bovinos con péptidos sintéticos conteniendo las regiones 141-156 y 200-213 de la proteína VP1 se ha demostrado que los linfocitos de algunos animales son capaces de reconocer epitopes T en estas zonas. Sin embargo, las células T de animales inmunizados con virus entero no responden a estos péptidos o lo hacen muy pobremente indicando que no son epitopes dominantes (Van Lierop y col., 1992).

Posteriormente, se identificó un epitope inmunodominante para células T entre los aminoácidos 20 y 34 de la proteína VP4 (Van Lierop y col., 1995). Este epitope se encuentra altamente conservado entre los distintos serotipos de VFA, despierta una respuesta heterotípica y es reconocido en el contexto de 4 haplotipos del CMH.

Recientemente se ha demostrado que la proteína no estructural 3D del VFA (ARN polimerasa ARN dependiente) es reconocida por células T de bovinos (Collen y col., 1998).

Hasta ahora, se desconoce la importancia de la respuesta T citotóxica en la protección frente al VFA. Sin embargo, el análisis fenotípico de linfocitos provenientes de animales vacunados o infectados mostró un aumento mayor de linfocitos T CD8+ luego del desafío en los animales infectados que en los vacunados (García –Valcarcel y col., 1998).

5.3 Influencia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en la respuesta inmune frente al VFA

El reconocimiento de los antígenos por las células T requiere de la presentación de los determinantes antigénicos en asociación con las moléculas del CMH. La estructura de los CMH clase I y II humanos fue resuelta por cristalografía de rayos X (Brown y col., 1993, Bjorkman y col., 1987). Se han identificado secuencias consenso y tamaños específicos para los péptidos asociados con las moléculas del CMH clase I y II. El CMH clase I acomoda péptidos más pequeños (8-10 aminoácidos) que el de clase II (13 a 17 aminoácidos). Los péptidos son presentados por el CMH clase II a los receptores T en la superficie de los linfocitos T colaboradores (CD4+) y por el CMH clase I a los receptores T en la superficie de los linfocitos T citotóxicos (CD8+).

El CMH en bovinos se denomina BoLA (*bovine lymphocyte antigen*) y sus genes codifican para moléculas de superficie altamente polimórficas (Spooner y col., 1978). Estos genes parecen tener una organización similar a los del CMH de humanos. Se han identificado 2 genes DQA y DQB, 1 gen DRA y 3 genes DRB (de los cuales uno es un pseudogen), 1

gen DNA, DOB y los genes DIB, DYA y DYB, cuya identificación es reciente. Se han utilizado varios métodos para caracterizar el polimorfismo de los genes y productos génicos del CMH clase II bovino. El polimorfismo de las proteínas se estudió mediante isoelectroenfoque unidimensional y métodos serológicos y la organización y polimorfismo a nivel genético mediante secuenciación de ADN y RFLP.

La falta de reconocimiento de un péptido de VFA por células T de bovinos se atribuyó a restricciones impuestas por el CMH de los bovinos (Glass y col., 1992). Los fragmentos de VFA obtenidos luego de un tratamiento suave con catepsina D (proteasa involucrada en el procesamiento de antígenos) fueron capaces de inducir una respuesta proliferativa en células T provenientes de bovinos de 8 haplotipos de CMH clase II diferentes. El análisis de la capacidad de los fragmentos individuales de estimular una respuesta T reveló que 5 de estos fragmentos incluían sitios de reconocimiento de células T. Sin embargo, ningún fragmento aislado fue capaz de estimular los linfocitos de los 8 animales experimentales, lo cual indica que las diferencias en el perfil de reconocimiento entre los animales podría ser consecuencia del haplotipo de CMH expresado (Van Lierop y col., 1994). Por estudios desarrollados en bovinos con 6 haplotipos diferentes del CMH clase II se evidenció una clara correlación entre los haplotipos del CMH clase II y la capacidad de inducir una respuesta proliferativa frente a diferentes péptidos sintéticos del VFA (Van Lierop y col., 1995). Sin embargo, la influencia del polimorfismo del CMH parece ser menos importante en la respuesta contra la partícula viral entera.

6. La vacunación contra el VFA

La prevención de enfermedades implica el establecimiento de los mecanismos de defensa del organismo y su activación previamente a la interacción con el patógeno específico, de manera que el hospedador inicie una rápida respuesta a la infección. En mamíferos, la vacunación es el método más económico y efectivo para tal fin.

El concepto básico para el diseño de una vacuna es simular en el hospedador la infección con el patógeno o, al menos, aquellos aspectos de la infección natural importantes para montar los mecanismos destinados a su eliminación y a la activación de memoria inmunológica.

No existe una única clase de vacunas aplicable a los diferentes tipos de patógenos animales y es de vital importancia conocer los mecanismos precisos de interacción, así

como los aspectos relevantes de la respuesta inmune involucrados en la eliminación de la infección.

El control de la fiebre aftosa se efectúa mediante la utilización de vacunas a virus inactivado por agentes químicos (Barteling y Vreeswijk, 1991). Este método de control permitió la erradicación de la enfermedad en numerosos países.

6.1 Vacunas inactivadas contra el VFA

La primera fuente de antígeno viral utilizada como vacuna fue el epitelio lingual de bovinos infectados. El virus se adsorbía a un gel de hidróxido de aluminio y luego se inactivaba con formaldehído.

A principios de la década del '50, Frenkel (1951) desarrolló un sistema de producción *in vitro* de VFA a gran escala utilizando cultivos primarios de epitelio lingual bovino crecidos en suspensión. Este método permitió la implementación de programas de vacunación. Las partículas virales luego de ser cosechadas, clarificadas y filtradas, se adsorbían a un gel de hidróxido de aluminio y se inactivaban con formaldehído. El sistema presentaba ventajas importantes como la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de producción viral y no requerían de adaptación del virus a cultivo de células. Las vacunas elaboradas por este método fueron aplicadas con éxito en diferentes países.

En la década del '60 se desarrollaron métodos de producción de virus en cultivo de células. Inicialmente, se utilizaron cultivos primarios de riñón bovino que más tarde se reemplazaron por cultivos de células BHK-21 (Mowat y Chapman, 1962), siendo éstos los más utilizados en la actualidad. No obstante, el método Frenkel sigue siendo utilizado en algunos países. En la actualidad, los antígenos de VFA utilizados en las vacunas se producen a escala industrial en células BHK-21 crecidas en suspensión (Radlett y col., 1985) en tanques fermentadores de hasta 5.000 litros.

Tradicionalmente, la inactivación del VFA se llevó a cabo con formaldehído, que actúa principalmente sobre la superficie del virión. Sin embargo, la inactivación con formol presentaba el riesgo de permanencia de infección residual y de pérdida de potencialidad inmunizante de la preparación por lo que fue reemplazado por las aziridinas. Inicialmente, se utilizó la acetietilenimina que luego fue reemplazada por la etilenimina (EI) y la etilenimina binaria (BEI), que son los inactivantes utilizados en la actualidad (Bahnmann, 1975).

Dado que el virus inactivado presenta baja inmunogenicidad, es necesario el agregado de sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimulantes.

Comercialmente, sólo se utilizan 3 adyuvantes en la elaboración de vacunas anti-aftosa: hidróxido de aluminio, saponina y emulsión oleosa. Las primeras vacunas que se desarrollaron fueron las acuosas que utilizaban hidróxido de aluminio o saponina como adyuvantes. Los animales vacunados con las vacunas acuosas se protegen por un período de 4 meses.

La introducción de adyuvantes oleosos, como el adyuvante de Freund incompleto (Freund y Thompson, 1945), significó un gran avance en el logro de estados de protección más duraderos. La formulación de vacunas oleosas fue perfeccionada en nuestro país con nuevas mezclas de aceites minerales (Rivenson y col., 1982). Estas formulaciones confirieron una inmunidad más efectiva y de mayor duración en bovinos y porcinos.

Las vacunas contra el VFA son productos muy crudos y contienen altas concentraciones de proteínas celulares en relación con la cantidad de proteínas estructurales y no estructurales de VFA. Las proteínas estructurales incluyen las partículas virales enteras (146S), cápsides vacías naturales (75S) y pentámeros de VP1, VP2 y VP3 (12S). La inmunogenicidad de las partículas 146S es mucho mayor que las de las partículas 75S y 12S (Doel y Chong, 1982), por lo que la integridad de las partículas 146S es crucial para la eficacia de las vacunas y la inestabilidad térmica de las vacunas puede ser responsable de la poca eficacia de algunas vacunas contra el VFA.

El nivel y duración de la inmunidad depende de la calidad de la vacuna, del número de vacunaciones recibidas y de la edad y patrimonio genético de los animales.

Las vacunas contra el VFA son sometidas a pruebas de seguridad y de potencia. Las pruebas de seguridad están dirigidas a constatar que las preparaciones vacunales estén libres de virus infeccioso. Esta prueba se lleva a cabo *in vitro* o *in vivo* y aquellas vacunas en las que se detecta replicación viral o que causan reacciones locales o de toxicidad no pasan esta prueba.

Las pruebas de potencia se llevan a cabo *in vivo*, aunque los ensayos *in vitro* están cobrando cada vez más aceptación. En América del Sur, la prueba de potencia se lleva a cabo mediante la inoculación de 16 bovinos con la dosis de vacuna sugerida y por la vía adecuada. Tres semanas después, los animales son desafiados con 10.000 dosis infectivas 50% intradermolingualmente y son observados durante 7 días. Los animales que presentan lesiones fuera del sitio de inoculación se consideran no protegidos. Las vacunas deben proteger al 75% de los animales para pasar la prueba. En la Argentina se requiere un 81% de eficiencia de la vacuna para pasar la prueba de potencia.

Dado que no existe inmunidad cruzada entre virus de distintos serotipos, la vacuna debe poseer una cepa representativa de cada serotipo actuante en una región. Si la cepa representativa de un serotipo no es suficiente para proteger contra todas las cepas de ese serotipo, deben incluirse más de una cepa de ese serotipo en la vacuna. La última vacuna utilizada en la Argentina, por ejemplo, era tetravalente, a pesar de que sólo circulaban tres serotipos. Esta vacuna incluía 2 cepas de serotipo A (A Argentina/79 y A Argentina/87), una cepa de serotipo C (C3 Argentina/85) y una cepa de serotipo O (O1 Caseros Ar/67).

6.2 Vacunas experimentales contra el VFA

A pesar de que las vacunas convencionales contra el VFA basadas en virus inactivado permitieron la erradicación de la fiebre aftosa en muchas regiones del mundo, el uso de dichas vacunas presenta desventajas tales como: 1) la necesidad de mantener una cadena de frío para preservar la estabilidad de la vacuna; 2) el riesgo de reintroducción de la enfermedad por inactivación incompleta del antígeno o por manipulación de virus infeccioso en las plantas productoras de vacunas, problemas que se relacionaron con el origen de brotes en Europa durante la última década (Beck y Strohmaier, 1987); 3) una composición química indefinida en cuanto al contenido de antígeno viral y a la presencia de contaminantes celulares, hecho que se relacionó con la generación de *shocks* anafilácticos en animales vacunados (Barteling y Vreeswijk, 1991); 4) la dificultad en la diferenciación de animales infectados de vacunados debido a la presencia de proteínas no estructurales en las preparaciones vacunales (Pinto y Garland, A. J. M., 1979).

Debido a las desventajas de las vacunas convencionales antes mencionadas y en vistas de que la enfermedad ha sido erradicada de numerosas zonas del mundo, se ha dirigido un esfuerzo considerable al desarrollo de vacunas alternativas contra el VFA.

Con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante, la secuenciación de ácidos nucleicos, la producción de anticuerpos monoclonales y la resolución de la estructura cristalográfica del VFA (Acharya y col., 1989, Fox y col., 1987, Lea y col., 1994) fue posible identificar las regiones de la partícula viral involucradas en la respuesta inmune. El clonado y expresión de genes, junto con la caracterización estructural de patógenos y la identificación de los epitopes inmunodominantes en la respuesta inmune humoral y celular permitieron la transferencia de información genética de un organismo a otro no relacionado y el diseño de nuevas estrategias de vacunación con vistas a salvar algunas de las dificultades relacionadas con las vacunas clásicas.

6.2.1 Vacunas a virus vivo modificado

El éxito de Sabin con la vacuna contra la poliomielitis a virus vivo modificado inspiró a otros investigadores a trabajar en la búsqueda de un VFA modificado e inocuo, que mantuviera su inmunogenicidad. Se obtuvieron cepas de VFA adaptadas a ratón y a otros modelos animales que parecían promisorias en el laboratorio (Mowar, 1961, 1964). Sin embargo, estos virus revertían a virulentos en experimentos a campo. La decisión de los países europeos de restringir la importación de carnes de los países donde se utilizaran tales vacunas llevó a la pérdida de interés por las mismas.

Otra estrategia utilizada fue la expresión de antígenos del VFA en vectores vivos como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), con el objetivo de establecer inmunidad en el tracto respiratorio superior. Este virus quimérico se construyó insertando secuencias de la hormona de crecimiento de bovinos río arriba de las secuencias inmunodominantes de la proteína VP1 del VFA O1 Kaufbeuren en la secuencia codificante para la glicoproteína III del virus IBR (Kit y col., 1991). La inoculación de este virus modificado en bovinos fue capaz de conferir protección frente al desafío con virus IBR e indujo una respuesta humoral contra los epitopes del VFA.

También se han construido virus vaccinia recombinantes que expresan la poliproteína P1 o la proteína VP1 del VFA serotipo C, que fueron capaces de inducir una respuesta humoral y celular específica contra el VFA (Sanz-Parra y col., 1998).

Posteriormente, la obtención de la copia completa del genoma de VFA (Zibert y col., 1990, Rieder y col., 1993) permitió la construcción de VFA de serotipo A12 atenuados por ingeniería genética. Una estrategia consistió en la construcción de un VFA en el cual los residuos RGD de la proteína VP1, involucrados en la entrada del virus a las células blanco, habían sido delecionados. Bovinos vacunados con este VFA modificado resultaron protegidos frente al desafío con una cepa virulenta (Mc Kenna y col., 1995). También se construyó un VFA modificado genéticamente por deleción de la secuencia codificante para la proteasa líder (L) (Piccone y col., 1995), que mostró ser atenuado en bovinos y porcinos y despertó una respuesta inmune parcialmente protectora en estos animales (Mason y col., 1997, Chinsangaram y col., 1998).

Estos experimentos demostraron el potencial del diseño racional de vacunas atenuadas contra el VFA .

6.2.2 Vacunas a subunidades

Debido a que la actividad inmunogénica del VFA se ve muy reducida después del tratamiento del virus con tripsina (Wild y col., 1967) y teniendo en cuenta que la proteína VP1 es la única afectada por éste tratamiento, se asumió que los sitios inmunodominantes del VFA se encontraban en esta proteína. Por esta razón, se trató de desarrollar una vacuna recombinante basada en la proteína VP1. La proteína VP1 del serotipo A fue expresada en *Escherichia coli* (Küpper y col., 1981, Kleid y col., 1981) y al ser inoculada en cerdos y bovinos indujo altos niveles de anticuerpos neutralizantes y protección frente al desafío (Kleid y col., 1981). Sin embargo, VP1 resultó ser varios órdenes de magnitud menos inmunogénica que cantidades equivalentes de la proteína inoculada en forma de virus entero.

Otra estrategia evaluada fue la expresión de los sitios antigénicos de la proteína VP1 del serotipo O (aminoácidos 137-152 y 199-213) fusionados al extremo amino terminal de la proteína β galactosidasa de *Escherichia coli* (Broekhuijsen y col., 1986, Winther y col., 1986). Los experimentos preliminares indicaron que la proteína de fusión que llevaba una única copia de los aminoácidos 137-152 no era capaz de despertar una respuesta protectora en cobayos. Sin embargo, fue posible inducir una respuesta inmune protectora en cobayos y cerdos vacunando con proteínas de fusión que contenían 2 ó 4 copias en tandem de los aminoácidos virales (Broekhuijsen y col., 1987). También se obtuvieron buenos niveles de protección en cobayos mediante la inoculación de una proteína de fusión entre dos sitios antigénicos del VFA del serotipo O (141-158 y 200-213) y la proteína TrpE de *Escherichia coli* (Giavedoni y col., 1991). Morgan y Moore (1990) lograron proteger cobayos, bovinos y cerdos inoculando los aminoácidos 137-168 de VP1 de serotipo A fusionado a la proteína TrpE de *Escherichia coli*.

Los fragmentos inmunogénicos del VFA se expresaron en forma de proteínas de fusión particuladas. El sitio inmunodominante del VFA se fusionó al extremo amino terminal de la proteína core y se expresó en células de mamíferos utilizando el virus vaccinia. La proteína core del virus de la hepatitis B al ser sobreexpresada se ensambla espontáneamente en partículas de 27 nm altamente inmunogénicas. Las partículas semejantes a virus obtenidas presentaron una inmunogenicidad comparable a la de la partícula viral y protegieron cobayos frente al desafío (Clarke y col., 1987). La expresión de esta proteína de fusión en el sistema vaccinia tuvo un rendimiento muy bajo por lo que la misma proteína de fusión se expresó en bacterias (Francis y Clarke, 1989) y levaduras (Beasley y col., 1990).

El sistema de expresión baculovirus-células de insecto se utilizó para expresar el precursor P1-2A como una proteína soluble no procesada que al ser inoculada en cerdos produjo una respuesta de anticuerpos baja pero dio una protección del 50% (Grubman y col., 1993). En este mismo sistema se expresó un dímero del sitio antigénico A del VFA de serotipo C3 como una proteína quimérica con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Esta construcción mostró ser altamente inmunogénica en ratones (Grigera y col., 1996).

6.2.3 Partículas vacías

A partir de células infectadas con VFA es posible aislar progenie viral y varios intermediarios de replicación. Estos son los protómeros 5S, que incluyen una copia de cada una de las 4 proteínas estructurales, los pentámeros 12S que consisten de 5 copias de los protómeros 5S y las cápsides vacías 70S, que contienen 12 copias de los pentámeros 12S. Estas últimas son partículas no infecciosas que carecen del ARN viral pero que contienen la misma forma y tamaño que el virus vivo (Ruecker, 1985). Las cápsides vacías naturales son capaces de unirse a células susceptibles (Rowlands y col., 1975) y son indistinguibles de la partícula viral entera cuando se las enfrenta a un panel de AcM (Grubman y col., 1985). Se ha demostrado que las partículas vacías son capaces de inducir niveles de anticuerpos neutralizantes similares a los de las partículas enteras estabilizándolas con formaldehído o sin tratar (Rowlands y col., 1975, Rweyemamu y col., 1979). La proporción de partículas vacías a enteras varía en las diferentes cepas virales (Rweyemamu y col., 1979).

Se ha utilizado el sistema baculovirus-células de insecto para producir partículas vacías mediante la expresión de un ADN copia (ADNc) que contiene las secuencias correspondientes al precursor P1-2A y las secuencias codificantes para las proteasas L y 3C (Roosien y col., 1990) pero la eficiencia de ensamblaje fue muy baja. La expresión del precursor de las proteínas estructurales del VFA (P1) y la proteasa 3C en *Escherichia coli* resultó en la síntesis y procesamiento del precursor P1 y el ensamblaje en partículas 70S. Estas partículas vacías reaccionaron con AcM neutralizantes que reconocen epitopes conformacionales y despertaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos (Lewis y col., 1991). También fue posible proteger cerdos frente al desafío viral utilizando extractos de *Escherichia coli* que expresan las partículas vacías (Grubman y col., 1993). La expresión de las secuencias codificantes para el precursor P1-2A y la proteasa 3C de 3 cepas distintas de VFA (O1K, A10 y A24 Cruzeiro) en el sistema de expresión del virus

vaccinia resultó en el auto ensamblaje del precursor P1 para formar cápsides vacías. Estas partículas mostraron una estructura antigénica similar a la de la partícula entera (Abrams y col., 1995).

6.2.4 Vacunas a péptidos sintéticos

Anderer y Schlumberger (1965) mostraron hace más de 30 años que la inoculación de fragmentos de la proteína de cápside del virus del mosaico del tabaco inducía la producción de anticuerpos capaces de reconocer la partícula viral entera. Otros estudios confirmaron ampliamente que inoculando péptidos sintéticos se inducían anticuerpos capaces de interactuar con la proteína nativa o la partícula viral entera (Arnon y col., 1971, Lerner y col., 1981, Müller y col., 1982).

La utilización de péptidos sintéticos como vacunas requiere la identificación de las secuencias aminoacídicas de la partícula viral que son capaces de evocar una respuesta inmune protectora. La identificación de las posibles secuencias inmunogénicas del VFA se llevó a cabo mediante distintas metodologías. Strohmaier y colaboradores (1982), utilizaron el método clásico de hidrólisis de la proteína VP1 con bromuro de cianógeno o enzimas proteolíticas y evaluaron la capacidad de los fragmentos obtenidos de despertar una respuesta de anticuerpos neutralizantes. De esta forma identificaron las regiones 146-154 y 200-213 de la proteína VP1 del VFA de serotipo O como posibles inductoras de anticuerpos neutralizantes. Otro enfoque para identificar regiones del VFA a ser utilizadas como vacunas a péptidos sintéticos fue el desarrollado por Bittle y colaboradores (1982). Estos autores compararon la secuencia aminoacídica de la proteína VP1 de VFA pertenecientes a los serotipos A, O y C y encontraron alta variabilidad en las regiones correspondientes a los aminoácidos 130-160 y 190-213 y atribuyeron esta variabilidad a la accesibilidad de estas regiones para la interacción con anticuerpos neutralizantes. Posteriormente, estudios de cristalografía de rayos X demostraron que estas regiones estaban expuestas en la superficie del virión (Acharya y col., 1989). También se identificaron secuencias candidatas a ser utilizadas en vacunas peptídicas mediante la utilización de algoritmos que predicen la estructura secundaria de proteínas basándose en las propiedades físicas de los aminoácidos de su secuencia primaria (Pfaff y col., 1982). De esta forma se identificó la secuencia 144-159 de la proteína VP1.

El hecho de que todos los enfoques para identificar zonas inmunogénicas en el VFA mostraron la importancia de la región 140-160 de VP1 determinó que los esfuerzos en el

diseño y evaluación de vacunas peptídicas contra el VFA se concentraran en estas secuencias.

La inoculación de péptidos sintetizados químicamente correspondientes a las secuencias 141-160 y 200- 213 de la proteína VP1 del serotipo O acoplados a la proteína *carrier* KLH despertaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes y protegieron animales de experimentación (Bittle y col., 1982). Estos estudios de inmunización con péptidos sintéticos demostraron que los mismos son capaces de despertar una respuesta de anticuerpos neutralizantes en animales de experimentación (cobayos y conejos) y bovinos pero no de generar una respuesta inmune protectora en bovinos. Por esta razón, los esfuerzos se concentraron en modificar los péptidos sintéticos para despertar una respuesta inmune protectora sin utilizar proteínas *carrier*.

Francis y colaboradores (1987) mostraron que la inoculación de un péptido sintético libre correspondiente a la región 141-160 de la proteína VP1 del serotipo O era capaz de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes en cobayos y proliferación *in vitro* de células T colaboradoras cuando se acoplaba al péptido un residuo de cisteína con un grupo sulfidrido sin bloquear en la región carboxilo terminal. También se demostró que era posible inducir una respuesta protectora en cobayos inoculando péptidos sintéticos libres (Volpina y col., 1990).

El primer ejemplo de protección de bovinos contra el VFA mediante la inoculación de péptidos sintéticos fue el reportado por Dimarchi y colaboradores (1986). En ese trabajo, la inoculación de un péptido que incluía las secuencias 200-213 y 141-158 de la proteína VP1 del VFA de serotipo O, unidas entre sí por un puente de prolina-prolina-serina y con la adición de dos cisteínas en el extremo amino terminal y la secuencia prolina-cisteína-glicina en el extremo carboxilo terminal confirió protección frente al desafío por inyección de virus infeccioso en el epitelio lingual.

Mediante experimentos de inmunización y protección en cobayos se demostró que el péptido sintético utilizado por Dimarchi fue el más eficiente entre otras construcciones evaluadas en despertar una respuesta inmune protectora (Doel y col., 1988). La vacunación con péptidos de éstas características representando las secuencias correspondientes al serotipo A, O y C confirieron protección total frente al desafío con virus homólogo en cobayos. Además, se obtuvo protección homotípica y heterotípica en bovinos con los péptidos de los serotipos A y O. El péptido del serotipo C fue menos eficiente en conferir protección heterotípica (Doel y col., 1990).

La respuesta inmune conferida por péptidos sintéticos en los hospedadores naturales mostró ser más pobre que la inducida en animales de experimentación. Esto se atribuyó a las restricciones impuestas por el CMH. Por esta razón, se adicionaron epitopes para células T a los péptidos sintéticos libres. Se describió que la adición de secuencias de la ovoalbúmina y la mioglobina de esperma de ballena, sintetizadas como péptidos híbridos en el extremo carboxilo terminal de péptidos representando secuencias del VFA, permitía superar las restricciones genéticas en ratones no respondedores (Francis y col., 1987, 1988). También se construyeron péptidos sintéticos híbridos llevando la secuencia 141-160 de la proteína VP1 y epitopes para células T derivados de *M. Tuberculosis*. En estos ensayos se demostró que la posición del epitope para células T en relación al epitope para células B podía ser crítica (Cox y col., 1988).

Recientemente, se han identificado distintos epitopes para células T en el VFA que estimulan la proliferación de linfocitos de sangre periférica en bovinos y porcinos y que son candidatos potenciales a ser incorporados en vacunas peptídicas contra el VFA (Collen y col., 1991, Rodriguez y col., 1994, Van Lierop y col., 1995).

A pesar de que la utilización de péptido sintéticos como vacunas potenciales contra el VFA dió resultados alentadores en animales de experimentación, los resultados obtenidos en hospedadores naturales (bovinos y porcinos) fueron menos prometedores. Los niveles de protección en bovinos mostraron ser pobres y muy variables. Sin embargo, el número de animales utilizados en los ensayos fue muy limitado y, en general, los péptidos inoculados carecían de epitopes fuertes para células T. En este trabajo, se llevó a cabo una evaluación del potencial de péptidos sintéticos como vacunas contra el virus de la fiebre aftosa en un número muy grande de bovinos.

II. Objetivos

Objetivos generales

Evaluar la posibilidad de utilizar vacunas basadas en péptidos sintéticos como herramienta en la lucha contra la fiebre aftosa (FA).

Evaluar y caracterizar la respuesta inmune y protección en bovinos conferida por péptidos sintéticos que representan epitopes del virus de la fiebre aftosa (VFA).

Identificar y caracterizar poblaciones de VFA variantes que escapan a la protección en bovinos vacunados con péptidos sintéticos derivados del VFA.

Objetivos particulares

Analizar las diferencias de la respuesta inmune inducida en bovinos por péptidos sintéticos simples y más complejos.

Analizar la importancia de las revacunaciones (*boosters*), dosis y esquemas de vacunación en la respuesta inmune contra el VFA, inducida en bovinos por péptidos sintéticos.

Evaluar la correlación entre la protección y diferentes parámetros inmunológicos al vacunar bovinos con péptidos sintéticos.

Analizar la importancia de la composición de genes del complejo mayor de histocompatibilidad bovino en la respuesta individual inducida por los péptidos sintéticos.

Analizar la importancia de la inclusión de epitopes T en el diseño de péptidos sintéticos.

Evaluar las implicancias de utilizar un repertorio limitado de epitopes en la vacunación contra virus a ARN, en cuanto a la aparición de variantes virales.

Caracterizar los virus rescatados de las lesiones de bovinos no protegidos frente al desafío viral desde el punto de vista genético, fenotípico y antigénico.

III. Materiales y Métodos

1. Virus

Para este trabajo se utilizó el virus C3 Argentina/85 (Piccone y col., 1988) provisto por GELAB/SENASA, obtenido de epitelio lingual bovino y clonado en placa en células BHK-21 (Feigelstock, 1995). Este virus fue aislado en Marcos Juárez, Córdoba, en diciembre de 1984 y formó parte de la vacuna antiaftosa desde 1985 hasta la fecha. Se amplificó mediante no más de tres pasajes en células de la línea BHK-21 clon 13 o bien en cultivos primarios de riñón fetal bovino (RFB).

2. Células

Se utilizó la línea BHK-21 clon 13 (Stoker y Mc Pherson, 1964) obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection). Las células se propagaron en monocapas (Mowat y Chapman, 1962) crecidas en placas de 60 y 100 mm de diámetro (Falcon) o botellas rotatorias de 2 litros en medio de cultivo MEM-D o MEM-E respectivamente (Eagle, 1959 y Dulbecco y Freeman, 1959), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco-BRL) y 50 µg/ml de Gentamicina (Gibco-BRL) como agente antibiótico. Cuando las células se crecieron en placas, se incubaron a 37°C bajo atmósfera de 5% CO₂, y cuando se crecieron en botellas rotatorias, se incubaron en una cámara de 37°C, agregando al medio de cultivo Hepes 25 mM pH 7,4 como solución *buffer*.

También se utilizaron cultivos primarios de células de riñón fetal bovino (RFB). Estas células se crecieron en monocapas en las mismas condiciones que las BHK-21 y con el agregado del doble de antibiótico (100 µg/ml). Se utilizaron células de no más de un pasaje en cultivo (cultivo secundario),(Rodríguez y Estrade, 1966).

3. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos utilizados en este trabajo se sintetizaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Barcelona por el grupo que dirige el Dr. David Andreu, utilizando una modificación del método de síntesis en fase sólida (Merrifield, 1963; Carreño y col., 1992). Las preparaciones peptídicas crudas se purificaron por filtración en gel (Sephadex G-10) seguida de cromatografía líquida en fase reversa. La pureza de los péptidos utilizados fue superior al 95%. Se evaluó la identidad de los mismos por análisis de aminoácidos y espectroscopía de masas. Los péptidos utilizados

poseen un residuo cisteína adicional en el extremo carboxilo que permite el acoplamiento de los mismos a proteínas soporte.

Los péptidos se diseñaron de acuerdo a la secuencia aminoacídica reportada para el VFA C3 Argentina 85 (Martínez y col., 1991) y contienen los dos sitios antigénicos continuos de la proteína VP1 (sitio A y sitio C) que incluyen epitopes reconocidos por células B (Mateu y col., 1990 y Mateu, 1995) o un epitope para células T que se describió inicialmente en VFA del serotipo O (Collen y col., 1991) pero cuya secuencia aminoacídica esta altamente conservada en todos los virus del serotipo C que se han secuenciado hasta el momento (Mateu y col., 1994 y Feigelstock y col., 1996). Existen datos que sugieren que el mismo induce una respuesta proliferativa en linfocitos de animales vacunados con VFA de serotipo C. En el momento en que se desarrollaron estos experimentos, éste era el único epitope para células T descrito en el VFA.

En la Tabla 1 se detallan los péptido sintéticos utilizados en los experimentos de inmunización de bovinos. El péptido A incluye los aminoácidos 138 a 156 de la proteína VP1 (la primera arginina corresponde a la posición 140a, Martínez y col., 1991) y representa el sitio antigénico inmunodominante (sitio A) localizado en el *loop* G-H de la proteína VP1, expuesto en la superficie del virión. El péptido AT incluye el sitio A y el epitope para células T correspondiente a los aminoácidos 21 a 40 de la proteína VP1. El péptido AC es el equivalente en VFA de serotipo C de la construcción utilizada por Dimarchi para el serotipo O (Dimarchi y col., 1986) e incluye los sitios antigénicos C y A unidos por un puente de dos prolina y una serina (PPS). El sitio C se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 (aminoácidos 196 a 209 de la proteína VP1) y al igual que el sitio A, contiene epitopes para células B. El péptido ACT incluye los dos epitopes continuos A y C unidos por el puente PPS y unidos al epitope T.

También se sintetizaron los péptidos A*, AT*, AC* y ACT* que se utilizaron en algunos experimentos de vacunación. Estos péptidos presentan sustituciones aminoacídicas en las posiciones 24, 140 y 197 de la proteína VP1 que se encontraron en las preparaciones del virus C3 Argentina 85 utilizado para preparar las vacunas de virus inactivado y para el desafío viral.

Tabla 1 : Péptidos sintéticos utilizados para la inmunización de bovinos.

| Péptido | Tamaño | Secuencia aminoacídica |
|-------------|--------|---|
| A | 21 | AGARRGDLAHLAAAHARHLPC |
| A* | 21 | V (140) |
| AT | 41 | ETQTQRRHHTDVAFLDRFVAGARRGDLAHLAAAHARHLPC |
| AT* | 41 | I (24) V (140) |
| AC | 38 | RHKQPLLAPAKQLLPPSAGARRGDLAHLAAAHARHLPC |
| AC* | 38 | Y (197) V (140) |
| ACT | 58 | ETQTQRRHHTDVAFLDRFVRHKQPLLAPAKQLLPPSAGARRGDLAHLAAAHARHLPC |
| ACT* | 58 | I (24) Y (197) V (140) |

Los péptidos utilizados en los experimentos de inmunización contienen las secuencias correspondientes a los sitios antigénico A (en letras rojas, aminoácidos 138 a 156 de la proteína VP1) y C (en letras verdes, aminoácidos 196 a 209 de la proteína VP1) del VFA de serotipo C3 y las de un epítipo para células T (en letras azules, aminoácidos 21 a 40 de la proteína VP1 del VFA de serotipo O). Las letras con doble subrayado representan aminoácidos no virales incluidos en los péptidos: cisteína terminal (C) y un puente de prolina-prolina-serina (PPS). Los péptido A*, AT*, AC* y ACT* presentan las sustituciones aminoacídicas indicadas respecto de la secuencia del VFA C3 Argentina 85 publicada (Martínez y col., 1991).

4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se sintetizaron utilizando el método de las fosforamiditas (Caruthers, 1982). En la Tabla 2 se resumen las principales características de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos de polaridad positiva son aquellos que tienen igual secuencia que el genoma del VFA y los de polaridad negativa son aquellos cuya secuencia es complementaria a la del genoma del VFA.

Tabla 2: Características de los oligonucleótidos utilizados.

| Nombre | Secuencia (5'- 3') | Polaridad | Posición * |
|---------|---|-----------|--------------|
| 2+Fin | GCCAACATAGCCCCGACCAACG | + | VP2, nt. 600 |
| pR5 | GGAGGGCCCAGGGTTGGACTC | - | 2B, nt. 6 |
| E7 | GGGGCGCCGTTGGGCACC | - | VP1, nt.281 |
| P1Low | aattggatccttaCAGCAGTTGTTTCGCCGGTGCGA | - | VP1, nt. 630 |
| P1Up | tcaggatccaatatgGGAGCCGGGCAATCCAGCCCCGCG | + | VP4, nt. 1 |
| SacUp | ACCGCGTCCAGTGAGGCTGA | + | VP3, nt. 501 |
| SacLow | AGTTTGTGTTTCTCCTCCGT | - | VP1, nt. 72 |
| C3VP1C | GCTGAACTCTACTGCCCCAG | + | VP1, nt. 537 |
| pR6 | GGCCCGTTTCATGCGCAC | - | VP1, nt.540 |
| 4R1 | CACTGGCAGCATAATTAAC | + | VP4, nt. 52 |
| EDVP3 | CAGTTGTCACCATGTTGCC | - | VP3, nt. 52 |
| 4+Fin | CAGCGGTCTTTTCGGTGCTC | + | VP4, nt. 228 |
| 2+up | CGGGTACGCAACAGTTGAGG | + | VP2, nt. 102 |
| 2HalfUp | CCCCACCAATTCATCAACC | + | VP2, nt. 429 |
| VP4Low | CCGCTGAAGGCAGAGCTGGC | - | VP4, nt. 233 |
| VP2Low | ATGACGACAAGCGTCCAGGG | - | VP2, nt. 545 |

Las letras mayúsculas indican las secuencias que hibridizan con el genoma viral y las letras minúsculas representan las secuencias ausentes en el genoma viral.

* La posición del oligonucleótido se indica con el nucleótido (nt) de la proteína viral que coincide con su extremo 5'.

5. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron cedidos por el Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España, por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil y por el Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e delle Emilia, Brescia, Italia.

Se utilizó un panel de 23 anticuerpos monoclonales, de los cuales 9 están dirigidos contra el sitio A, 9 están dirigidos contra el sitio D, 1 está dirigido contra el sitio C (7JA1) y 4 no están mapeados. Excepto 7DF10 y 7BH11, los demás anticuerpos monoclonales

utilizados son neutralizantes. El anticuerpo 7BH11 reconoce un epítopo discontinuo no mapeado pero conservado en todas las cepas de VFA de serotipos A, O y C evaluadas hasta el momento y que se utilizó como control de integridad viral. Todos los anticuerpos monoclonales utilizados fueron inducidos por virus de serotipo C (Mateu y col. 1990 y Lea y col. 1994).

En la Tabla 3 se resumen las principales características de los anticuerpos monoclonales utilizados.

6. Animales de experimentación

Para los experimentos de vacunación, se utilizaron bovinos de la raza Hereford de aproximadamente 12 meses de edad (250 a 280 Kg cada uno) provenientes de la Patagonia argentina, zona libre de fiebre aftosa en el momento en que se desarrollaron estos experimentos. Se confirmó la ausencia de anticuerpos específicos contra VFA por ensayos de seroneutralización con el virus C3 Argentina 85. Todos los animales presentaron un estado sanitario muy bueno previo al comienzo de los experimentos de vacunación.

Para los experimentos de seroprotección en ratón lactante y para la determinación de la dosis letal 50% ratón lactante se utilizaron ratones lactantes de la línea Balb/C de 5, 6 o 7 días de edad (Skinner y col., 1953).

Tabla 3: Características de los Anticuerpos monoclonales utilizados

| Anticuerpo Monoclonal | Virus inductor | Isotipo | Reactividad con virus homólogo | | Neutralización de virus homólogo | Sitio |
|-----------------------|------------------|---------|--------------------------------|------|----------------------------------|-------|
| | | | ELISA | EITB | | |
| SD6 | CS8 clón | IgG1 | + | VP1 | + | A |
| 7JD1 | C3 Indaial Br/71 | IgG1 | + | VP1 | + | A |
| 7FC12 | C3 Indaial Br/71 | IgG1 | + | VP1 | + | A |
| 7AH1 | C3 Indaial Br/71 | N. D. | + | VP1 | + | A |
| 7EE6 | C3 Indaial Br/71 | IgG3 | + | VP1 | + | A |
| 7AB5 | C3 Indaial Br/71 | IgG3 | + | VP1 | + | A |
| 7CA8 | C3 Indaial Br/71 | IgG3 | + | VP1 | + | A |
| 7CH1 | C3 Indaial Br/71 | IgG1 | + | VP1 | + | A |
| 7CA11 | C3 Indaial Br/71 | IgG1 | + | VP1 | + | A |
| 7JA1 | C3 Indaial Br/71 | IgG2b | + | VP1 | + | C |
| 1G5 | C1 Brescia It/64 | IgG2b | + | - | + | D |
| 3G11 | C1 Brescia It/64 | IgG1 | + | - | + | D |
| 2A12 | C1 Brescia It/64 | IgG3 | + | - | + | D |
| 2E5 | C1 Brescia It/64 | IgG1 | + | - | + | D |
| 4D7 | C1 Brescia It/64 | IgG1 | + | - | + | D |
| 4F4 | C1 Brescia It/64 | IgG1 | + | - | + | D |
| 5H10 | C1 Brescia It/64 | N. D. | + | - | + | D |
| 5C4 | C1 Brescia It/64 | IgG2b | + | - | + | D |
| 3E9 | C1 Brescia It/64 | IgG2b | + | - | + | D |
| 8E8 | C1 Vosges Fr/60 | N. D. | + | - | + | N. D. |
| 7DF10 | C3 Indaial Br/71 | IgG1 | + | - | - | N. D. |
| 1BH8 | C3 Indaial Br/71 | N. D. | + | - | + | N. D. |
| 7BH11 | C3 Indaial Br/71 | IgG2b | + | - | - | N. D. |

Todos los anticuerpos monoclonales utilizados se obtuvieron con virus de la fiebre aftosa serotipo C. En la tabla se muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales en ensayos de ELISA, Western blot (EITB) y neutralización de la infectividad viral. También se indica el sitio antigénico que reconocen. N.D.: no determinado.

7. Vacunación de bovinos con péptidos sintéticos

7.1 Inactivación del virus infectivo

El VFA infectivo se inactivó químicamente con etileniminas (Bahneman y col., 1974). Para ello, se preparó una solución de bromoetilamina 0,1M en NaOH 0,2M que se incubó durante 1 hora en agitación a 37°C. Al VFA preparado a una concentración de 2 µg/ml en medio MEM-E pH 7,5, se le agregó la solución de bromoetilamina a una concentración final del 3% y se incubó a 26°C durante toda la noche y con agitación. Posteriormente, se neutralizó la solución de VFA y bromoetilamina con tiosulfato de Na 1M a una concentración final del 3%. El virus inactivado se conservó a 4°C hasta el momento de su uso.

7.2 Formulación de las vacunas

Los péptidos sintéticos se disolvieron en buffer fosfato salino (PBS) a la concentración adecuada según el experimento y se emulsionaron con un volumen igual de adyuvante oleoso (Arlacel A-Marcop 52 [1:7]-1% tween 40) por goteo de la solución acuosa mezclada con el tween 40 sobre la fase oleosa en morteros de porcelana (Rivenson y col., 1982). Para la formulación de la vacuna convencional, se inactivaron químicamente 2 µg de virus C3 Argentina 85 como se describió en el punto anterior y se emulsionaron de la misma forma que las vacunas peptídicas. Las vacunas placebo se formularon emulsionando PBS con adyuvante oleoso. Las dosis administradas fueron de 3 ml por animal.

7.3 Vacunación y desafío

Los animales fueron mantenidos en corrales aislados de otros animales durante todas las experiencias y en boxes de aislamiento durante el desafío.

Las vacunas se inocularon por vía subcutánea. Los controles positivos de cada experiencia se inocularon con vacuna convencional y los controles negativos con PBS emulsionado con adyuvante oleoso.

Los animales se desafiaron por inoculación intradérmica en la lengua de 10.000 dosis infectivas 50% ratón lactante de VFA C3 Argentina 85 (Skirner y col., 1953). Se examinaron periódicamente en la boca, lengua, labios, mucosa bucal y patas durante 7 días (en algunos experimentos los bovinos se mantuvieron hasta 10 días después del desafío) y la aparición de lesiones en cualquiera de estas zonas se consideró como ruptura de inmunidad. Aquellos animales que no presentaron lesiones durante 7 días

post-desafío fueron considerados protegidos (+) y los que presentaron lesiones durante este tiempo se consideraron no protegidos (-). Finalizada la experiencia, los bovinos se sacrificaron y se incineraron para evitar liberación de virus aftoso al ambiente.

7.4 Esquemas de vacunación

Se desarrollaron 5 experimentos con tres esquemas de vacunación diferentes: corto, intermedio y largo. En todos los casos los animales recibieron una inoculación y un refuerzo (*booster*). En la Tabla 4 se esquematizan los tiempos de vacunación y desafío de los diferentes esquemas de vacunación, referidos al día de la primera inoculación.

Tabla 4: Esquemas de inmunización utilizados en los experimentos de vacunación de bovinos con péptidos sintéticos

| Esquema | Primera inmunización | Segunda inmunización | Desafío |
|------------|----------------------|----------------------|---------|
| Corto | Día 0 | Día 26 | Día 46 |
| Intermedio | Día 0 | Día 35 | Día 69 |
| Largo | Día 0 | Día 96 | Día 138 |

7.5 Experimento de vacunación N° 1

Para este experimento se utilizaron 31 bovinos que se inocularon siguiendo el esquema de vacunación corto con 1 mg (dosis alta) ó 0,1 mg (dosis baja) del péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT, AC y ACT. Todos los animales recibieron un *booster* con 0,1 mg de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT, AC o ACT. Se incluyeron 3 animales control, 2 de ellos se vacunaron con virus inactivado y 1 con PBS. En este experimento no se evaluó protección (los animales no fueron desafiados).

Esquema de vacunación utilizado en el experimento N°1:

| Péptido | Dosis | Número de animales |
|---------------|-------|--------------------|
| A | Alta | 3 |
| | Baja | 4 |
| AT | Alta | 3 |
| | baja | 3 |
| AC | Alta | 4 |
| | Baja | 4 |
| ACT | Alta | 4 |
| | Baja | 3 |
| Vacuna viral | | 2 |
| Placebo (PBS) | | 1 |

7.6 Experimento de vacunación N° 2

Este experimento siguió el esquema de inmunización intermedio. Se utilizaron 35 animales que se inocularon con las dos dosis detalladas en el experimento N°1. En este experimento se evaluó protección al desafío viral.

Esquema de vacunación utilizado en el experimento N°2:

| Péptido | Dosis | Número de animales |
|---------------|-------|--------------------|
| A | Alta | 3 |
| | Baja | 3 |
| AT | Alta | 3 |
| | baja | 6 |
| AC | Alta | 3 |
| | Baja | 5 |
| ACT | Alta | 2 |
| | Baja | 6 |
| Vacuna viral | | 2 |
| Placebo (PBS) | | 2 |

7.7 Experimento de vacunación N° 3

En este experimento se utilizó el esquema de vacunación corto que se utilizó en el primer experimento. Se utilizaron 34 animales que recibieron dos inoculaciones con 2 mg de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT y ACT. En esta experiencia se evaluó protección al desafío viral.

Esquema de vacunación utilizado en el experimento N°3:

| Péptido | Número de animales |
|---------------|--------------------|
| A | 10 |
| AT | 10 |
| ACT | 10 |
| Vacuna viral | 3 |
| Placebo (PBS) | 1 |

7.8 Experimento de vacunación N° 4

Para este experimento se utilizaron 15 bovinos y se siguió el esquema de inmunización corto. Los animales se inocularon con los péptidos AT* y ACT* y recibieron 2 inoculaciones de cantidades equimolares a 2 mg de Péptido A*. Seis animales recibieron péptido AT*, 5 animales recibieron péptido ACT*, 2 animales vacuna viral y 2 animales PBS.

7.9 Experimento de vacunación N° 5

En este experimento se utilizaron 24 bovinos que recibieron dos inoculaciones de 2 mg de péptido A* cada una. Los bovinos se dividieron en tres grupos y cada grupo se sometió a un esquema de inmunización diferente (corto, intermedio o largo). Los animales se desafiaron con VFA C3 Argentina 85.

Esquema de vacunación utilizado en el experimento N°5:

| Péptido | Esquema | Número de animales |
|---------------|--------------------|--------------------|
| A | Corto | 6 |
| A | Intermedio | 6 |
| A | Largo | 6 |
| Vacuna viral | Corto / intermedio | 2 |
| Vacuna viral | largo | 2 |
| Placebo (PBS) | Corto / intermedio | 1 |
| Placebo (PBS) | largo | 1 |

8. Toma de muestras

8.1 Sangre

Los bovinos se sangraron por la vena yugular.

Para la preparación de suero, la sangre se colectó en frascos de vidrio no estériles que se incubaron inclinados a 37°C hasta que se formara el coágulo. Posteriormente, se pasaron a 4°C para que los coágulos exudaran y el suero se clarificó por centrifugación durante 15 minutos a 4°C a 2000 rpm. Los animales se sangraron antes de recibir la primera inmunización (suero preinmune), antes de recibir el *booster* (suero pre *booster*) e inmediatamente antes del desafío (suero post *booster*).

Para la preparación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) utilizadas en los ensayos de linfoproliferación, la sangre se recogió estérilmente en presencia de EDTA 5 mM pH 7,2 (anticoagulante), en la fecha correspondiente a la sangría posterior al *booster*.

La sangre recogida en presencia de anticoagulante se utilizó también para la extracción de ADN de CMSP (Miller y col., 1988) para la tipificación de antígenos del CMH clase II de bovinos (Van Eijk y col., 1992).

8.2 Lesiones

Se tomó material de las lesiones virales aparecidas en patas, lengua y morro de los animales no protegidos durante los 7 días posteriores al desafío. De cada animal se

tomaron varias muestras provenientes de lesiones diferentes. Este material se utilizó para el aislamiento y caracterización del VFA presente en las lesiones.

9. Producción de virus C3 Argentina 85

En todos los experimentos se utilizó un clón viral derivado del VFA C3 Argentina 85 por clonado en placa y amplificado en células BHK-21 o RFB mediante no más de 3 pasajes.

9.1 Virus utilizado en el desafío y en los ensayos de seroneutralización

El virus utilizado en el desafío viral y en los ensayos de neutralización de la infectividad viral, se amplificó por infección de células BHK-21 crecidas en botellas rotatorias de 2 litros con medio de cultivo MEM-E y a 37°C, hasta observar un efecto citopático total. Se cosechó el sobrenadante de la infección se clarificó durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C, se alicuotó y se congeló a -80 °C.

Se descongeló una alícuota y se determinó el título del stock viral en ratón lactante y en cultivo de células BHK-21.

9.2 Virus para estimulación de linfocitos

El virus que se utilizó en los ensayos de linfoproliferación se amplificó mediante infección de células BHK-21 crecidas en botellas rotatorias de 2 litros. Se colectó el sobrenadante de infección, se clarificó a 10.000 rpm durante 20 minutos y se concentró por ultracentrifugación durante 90 minutos a 40.000 rpm y a 4 °C a través de un colchón de sacarosa 20 % en buffer NET 1X (50 mM Tris-HCl pH 7, 100mM NaCl, 1mM EDTA), (Mateu y col., 1987) en un rotor Kontron TFT 45.94. Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con buffer NET 1X y se resuspendió en 500 µl del mismo buffer. Un preparado de virus C purificado por CsCl y cuantificado por absorbancia (Sáiz y col., 1989) se utilizó como patrón para estimar la masa viral de las preparaciones mediante ensayos de inmunodot (Sáiz y col., 1989). Brevemente, cantidades conocidas del virus patrón y diluciones seriadas de las preparaciones virales semipurificadas cuyas masas se deseaba estimar, se fijaron por filtración a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad), previamente estabilizadas en buffer PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄). Las membranas se bloquearon por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de 5% leche descremada en buffer PBS 1X y

luego se incubaron durante 2 horas con una dilución 1/100 en 3% leche descremada en PBS 1X del anticuerpo monoclonal 7BH11, que reacciona con un epítopo discontinuo y conservado en los distintos serotipos. Las membranas se lavaron 3 veces con PBS 1X, 0,05% Tween 20 y se incubaron durante 1 hora con una dilución 1/1.000 de un anticuerpo antiratón conjugado a peroxidasa (KPL). Se repitieron los lavados y se revelaron las membranas con una solución conteniendo 0,015% H₂O₂, 0,5 mg/ml 4-Cloro 1-Naftol. Se detuvo la reacción lavando las membranas con agua y se cuantificó la reactividad de las muestras por comparación con la reactividad del virus patrón en un digitalizador de imágenes (Fotodyne Inc).

10. Titulación de stocks virales

10.1 Titulación por ensayo de placas

Se inocularon 300 µl de diluciones seriadas al 1/10 de los *stocks* virales sobre monocapas de BHK-21 crecidas en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C (en estufa de CO₂ y con agitación suave cada 15 minutos). Se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con 3 ml de medio semisólido conteniendo 1 volumen de MEM-D 2X, 1 volumen de agar noble al 2% (Difco), suero fetal bovino al 1% final, Hepes 25 mM y gentamicina 50 µg/ml (Augé de Mello, 1976). Las placas se incubaron en estufa gaseada a 37°C durante 48 horas hasta que se desarrollaran placas virales de un tamaño adecuado. Las células se fijaron con formol al 4% en agua durante 5 minutos, se retiró la capa de agar bajo chorro de agua y luego se tiñeron las monocapas con cristal violeta al 1% en agua destilada durante 5-10 minutos. Finalmente, se lavaron con abundante agua y se contaron las placas virales formadas. El título viral se determinó multiplicando el número de placas por el factor de dilución correspondiente y por 3,3 ya que se inocularon 0,3 ml de dilución viral por pocillo y el título viral se expresó como unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml).

10.2 Titulación en ratón lactante

Para determinar el título en ratón lactante del *stock* viral utilizado en el desafío de bovinos, se realizaron diluciones seriadas al 1/10 y se inocularon 50 µl de cada dilución por vía intramuscular a 6 ratones lactantes de 5, 6 ó 7 días de vida. Al cabo de siete días,

se contó el número de ratones lactantes muertos por dilución y se calculó la dosis letal 50% ratón lactante (Reed y Muench, 1938, Skinner y col., 1953).

11. Ensayos de linfoproliferación

La sangre de bovinos recogida estérilmente se utilizó inmediatamente para la extracción de CMSP por centrifugación sobre un colchón de Lymphopaque (Collen y Doel, 1990). Brevemente, se centrifugaron 40 ml de sangre durante 30 minutos a 2.500 rpm y se colectó la interfase blanca del buffy coat presente entre el suero (fase superior) y los glóbulos rojos (fase inferior). Se diluyó al 1/2 con PBS, se sembró sobre 6 ml de "Lymphoprep" ($\delta=1,077$ g/l, nycomed) y se centrifugó durante 30 minutos a 2.500 rpm. Se colectó la banda blanca enriquecida en células mononucleares, se lavó con PBS y las células se resuspendieron a una concentración final de 2×10^6 células/ml en medio de cultivo RPM I 1640 (Gibco BRL) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 25 mM Hepes y gentamicina a concentración final de 50 μ g/ml.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos para cultivo de tejidos (Falcon). Las CMSP de cada animal se enfrentaron con virus entero y con péptido. Las placas se tapizaron con 100 μ l de 6 diluciones seriadas al 1/5 de virus purificado por colchón de sacarosa de concentración 150 μ g/ml o con 100 μ l de 6 diluciones seriadas al 1/2 de los péptidos sintéticos (concentración 20 μ g/ml). Todas las diluciones se hicieron en medio RPMI. Se dejaron 6 pocillos por animal sin antígeno a los que se les agregó medio de cultivo. Tres de estos pocillos se utilizaron como control negativo y los 3 restantes como control positivo de estimulación, agregando 100 μ l de concanavalina A a una concentración de 12,5 μ g/ml. Posteriormente, se agregaron a los pocillos 100 μ l de CMSP (200.000 células) de modo que la concentración de antígeno en la placa quedó diluido a la 1/2 (75 μ g/ml para el primer pocillo de virus entero y 10 μ g/ml para el primero de péptido). Cada punto se realizó por triplicado. Las placas se incubaron en estufa de CO₂ a 37°C durante 5 días y luego se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada por pocillo (10 μ l de 0,1 mCi/ml diluido en PBS). La incorporación de radioactividad al ADN celular se midió tras 6 horas de marcación. Los resultados corresponden al valor más alto hallado para cada animal y se expresan como el índice de estimulación (I.E.), que es el cociente entre la radioactividad incorporada en presencia del antígeno (péptido o VFA) y la incorporada en

los pocillos con medio solo. La respuesta se consideró positiva cuando el I.E. fue superior o igual a 3.

12. Seroprotección en ratón lactante

La dosis protectora 50% en ratón lactante se determinó mediante un ensayo de seroprotección utilizando una cantidad constante de suero y virus variable. Se inocularon por vía subcutánea ratones lactantes de la línea Balb/c de 5, 6 o 7 días de vida con 100 μ l de suero bovino sin diluir y previamente inactivado por calor (30 minutos a 56°C). Se inocularon ratones control con sueros de bovinos no inmunizados (control negativo) y con sueros de bovinos vacunados con virus entero inactivado. Al cabo de 2 horas se inocularon intramuscularmente los ratones lactantes con 50 μ l de diluciones seriadas al 1/10 de VFA C3 Argentina 85. Paralelamente, se tituló el virus utilizado en el experimento en ratones lactantes vírgenes. Los animales se observaron durante 7 días y se contaron los ratones muertos para cada dilución de virus. Los títulos virales se calcularon como fue reportado por Skinner y col., (1953). El índice de protección se calculó como la diferencia entre el título del virus y el título de la mezcla suero-virus para cada suero bovino.

13. Ensayos de neutralización de la infectividad viral

Se llevaron a cabo *in vitro* por reducción del número de placas (Habel, 1969) en monocapas de células BHK-21 crecidas a un 80% de confluencia. Se incubaron aproximadamente 150 unidades formadoras de placa (ufp) del VFA en un volumen de 200 μ l, con un volumen igual de diluciones seriadas de los sueros de animales inmunizados con péptidos o de anticuerpos monoclonales, durante 1 hora a temperatura ambiente y media hora a 4°C. Se inocularon 300 μ l de las mezclas sobre monocapas de BHK-21 crecidas en placas de 60 mm de diámetro y se incubaron durante 1 hora a 37°C en estufa de CO₂, con agitación cada 15 minutos. Se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con 3 ml de medio semisólido conteniendo 1 volumen de MEM-D 2X, 1 volumen de agar noble al 2% (Difco), suero fetal al 1% final, Hepes 25 mM y gentamicina 50 μ g/ml (Augé de Mello, 1976). Las placas se incubaron en estufa gaseada a 37°C durante 48 horas hasta que se desarrollaran placas virales de un tamaño adecuado. Las células se fijaron con formol al 4% en agua durante 5 minutos, se retiró la capa de agar

bajo chorro de agua y luego se tiñeron las monocapas con cristal violeta al 1% en agua destilada durante 5-10 minutos. Finalmente, se lavaron con abundante agua, se contaron las placas virales formadas y se calculó el porcentaje de placas formadas. Para ello, en cada ensayo se incluyeron controles de VFA sin neutralizar que sirvieron para determinar el 100% de ufp en cada ensayo y a partir de este valor, se calcularon los porcentajes de placas obtenidas para cada dilución de suero o anticuerpo monoclonal.

Los títulos de neutralización se calcularon como el \log_{10} de la inversa de la dilución de suero o anticuerpo monoclonal que redujo el número de placas al 50%.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado.

13.1 Neutralización con sueros de bovinos

Con los sueros de bovinos que sólo habían recibido una inoculación con péptidos sintéticos (sueros pre *booster*), se realizaron 4 diluciones seriadas al 1/3 a partir de 1/5 (1/5, 1/15, 1/45 y 1/135) y para aquellos que provenían de animales que habían recibido dos inoculaciones (sueros post *booster*), se utilizaron 4 diluciones seriadas al 1/4 a partir de 1/10 (1/10, 1/40, 1/160 y 1/640). Estos ensayos se realizaron con el VFA C3 Argentina 85 utilizado para el desafío viral.

13.2 Neutralización con anticuerpos monoclonales

Para estos ensayos se utilizaron los VFA variantes aislados de las lesiones de los bovinos no protegidos frente al desafío viral y se incluyó el VFA utilizado en el desafío como control. Las diluciones de anticuerpo monoclonal utilizadas fueron: 1/10, 1/100, 1/500, 1/2.500, 1/12.500 y 1/62.500 (dos diluciones seriadas al 1/10 y 4 diluciones seriadas al 1/5). Se determinó el título neutralizante 50% (TSN 50%) de cada AcM para cada variante viral y para el virus utilizado en el desafío y se calculó la reactividad relativa (R_i) como el cociente entre el TSN 50% de la variante viral y el del virus del desafío para cada AcM. La reactividad relativa fue considerada positiva ($R_i > 0,1$), intermedia ($0,01 < R_i < 0,1$), débil ($0,001 < R_i < 0,01$) o negativa ($R_i < 0,001$), (Mateu y col., 1988).

14. Caracterización genómica de los aislamientos virales**14.1 Aislamiento de ARN viral.**

Todas las manipulaciones de ARN se realizaron con materiales y soluciones esterilizados y tratados con dietilpirocarbonato (DEP, Sigma) y se trabajó constantemente con guantes.

14.1.a Extracción de ARN de lesiones

El ARN viral provenientes de las lesiones de bovinos no protegidos se obtuvo por el método de guanidinio ácido-fenol-cloroformo (Chomczynsky y Sacchi, 1986). Se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de epitelio de lengua o patas en mortero con 1 ml de solución desnaturizante D (Tiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcocyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 0,1 M) a temperatura ambiente. El homogenato se transfirió a un tubo de polipropileno y se agregaron secuencialmente 0,1 ml de acetato de sodio 2M pH 4, 1 ml de fenol saturado en agua y 2 ml de una mezcla 49 :1 de cloroformo-alcohol isoamílico invirtiendo el tubo luego del agregado de cada reactivo. La suspensión final se incubó durante 15 minutos en hielo y se centrifugó durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Luego de la centrifugación, el ARN se encuentra en la fase acuosa y el ADN y las proteínas en la interfase y en la fase fenólica. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 ml de isopropanol y el ARN se precipitó a -20 °C durante por lo menos 1 hora y se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 12.000 rpm. El precipitado obtenido se resuspendió en 0,3 ml de solución D y se precipitó con 1ml de isopropanol durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 4°C, el precipitado de ARN se resuspendió en etanol 75%, se centrifugó nuevamente a 4°C durante 10 minutos y se secó por vacío. El precipitado obtenido se resuspendió en 50 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,5% en agua-DEP a 65°C por 10 minutos.

14.1.b Extracción de ARN viral de sobrenadante de células infectadas

A 200 µl del sobrenadante de células en cultivo infectadas con VFA se le agregaron 10 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml, Sigma) y se incubaron a 37°C durante 20 minutos y luego a 45°C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K. A continuación, se realizaron dos extracciones fenólicas y se recuperó la fase acuosa. El ARN viral se precipitó a -20°C durante 1 hora agregando 1µl de ARN de transferencia (Sigma) y 550 µl de etanol 100% frío. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a

12.000 rpm a 4°C, el precipitado se lavó con etanol 70% frío, se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de agua-DEP. El ARN se precipitó nuevamente agregando 10 µl de TNE 10X (1M NaCl, 100mM Tris-HCl y 10 mM EDTA) y 100µl de etanol 100 % frío a -20°C durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 4°C por 20 minutos, el precipitado se lavó con etanol 70 %, se secó por vacío y se resuspendió en 50 µl de agua-DEP. Luego, se agregaron 50µl de acetato de amonio 5M y 250 µl de etanol 100 frío y se precipitó el ARN a -20 °C durante 1 hora. Se recogieron los precipitados por centrifugación, se lavaron con etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en 50 µl de agua-DEP.

14.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN obtenido de lesiones o de sobrenadante de células infectadas, se sintetizó el ADNc mediante una reacción de retrotranscripción (RT). Para ello, a 200 ng de ARN se le agregaron 200 ng de un oligonucleótido de polaridad opuesta a la del ARN viral (polaridad negativa, Tabla 2), en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó durante 2 minutos a 90°C para desnaturalizar el ARN, luego 5 minutos a la temperatura de anillado específica del oligonucleótido utilizado y finalmente se colocó en hielo. Se preparó una mezcla de un volumen final de 90 µl con 10 µl de buffer RT/Taq 10X (500mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 50 mM DTT), 4 µl de deoxinucleótidos 5mM, 0,5 µl de la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (200U/µl, Gibco) y agua -DEP, que se agregó a la mezcla de ARN y oligonucleótido. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se hirvió durante 1 minuto.

14.3 Reacción de PCR

Para la reacción de PCR, se utilizaron 50 µl de la reacción de transcripción reversa a los que se agregaron 100 ng de un oligonucleótido de igual polaridad a la del ARN viral (este oligonucleótido se seleccionó de acuerdo a la región que se deseaba amplificar) y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega). La reacción se cubrió con aceite mineral y se sometió a las siguientes condiciones de amplificación:

| | | |
|---------------------------|-------------------|-----------------|
| Desnaturalización inicial | | 2 min, 95°C |
| 35 ciclos | desnaturalización | 1 min, 95°C |
| | <i>annealing</i> | 1 min, 50-60°C* |
| | extensión | 2 min, 72°C |

*En cada reacción de amplificación se utilizó la temperatura de *annealing* óptima para cada par de oligonucleótidos.

Las combinaciones de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos de ARN viral por RT-PCR, su polaridad y el tamaño de fragmento obtenido se detallan en la Tabla 5. Estos fragmentos cubren toda la región codificante para las cuatro proteínas estructurales (P1).

Tabla 5: Combinaciones de oligonucleótidos utilizadas para amplificar fragmentos de ARN viral mediante RT-PCR.

| Oligonucleótidos | polaridad | tamaño del fragmento |
|------------------|-----------|----------------------|
| PR5 2+Fin | - + | 1365 pb |
| P1Low 2+Fin | - + | 1354 pb |
| P1Low P1Up | - + | 2224 pb |
| Sac Low P1 Up | - + | 1557 pb |
| P1 Low Sac Up | - + | 798 pb |

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos se expresa en pares de bases (pb).

Para asegurar que los fragmentos resultantes de la RT-PCR fueran específicos y no producto de contaminaciones, en cada evento de síntesis de ADNc se incluyó un control negativo en el que se incluyeron todos los reactivos excepto ARN, que luego fue tratado como una muestra más en las reacciones de PCR. La ausencia de amplificación en esta reacción aseguró la ausencia de contaminación en cualquiera de los reactivos. También se incluyeron controles positivos en los cuales se sintetizó ADNc a partir de ARNs ya testeados.

14.4 Purificación de los fragmentos obtenidos por RT-PCR

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en geles preparativos de 1% de concentración de agarosa con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y en buffer TAE (Tris-acetato 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 Volts/cm y a temperatura ambiente. Las muestras de ADN se sembraron en el gel, previo agregado de 1/10 del volumen de la muestra de buffer de siembra (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%, TAE 10X). Se incluyó en la corrida un marcador de peso molecular (ladder de 1Kb, Gibco-BRL). Luego de la corrida, las bandas se visualizaron por fluorescencia a la luz UV, se escindieron del gel y se purificó el ADN por el método de GeneClean (Bio 101). Para cuantificar la cantidad de ADN obtenida luego de la purificación se corrieron geles analíticos en los que se sembró un 10% de los productos purificados.

14.5 Secuenciación de ácidos nucleicos

Las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes para las proteínas estructurales de los virus aislados de lesiones o amplificadas por pasajes en células se obtuvieron por secuenciación directa de los productos provenientes de reacciones de RT-PCR. Se utilizó el método de terminadores de cadena de Sanger (Sanger y col., 1977) con el sistema *fmol Sequencing System* (Promega) que utiliza análogos deaza de nucleótidos. Cada reacción se realizó a partir de 50 ng del ADN obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos sintéticos mostrados en la Tabla 2 y [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP (1mCi/mmol, Dupont) como nucleótido radioactivo. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador (Biometra Trio Thermoblock).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

| | | |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | | 2 min, 95°C |
| 35 ciclos | desnaturalización | 30 seg, 95°C |
| | <i>annealing</i> | 30 seg, 50-60°C* |
| | extensión | 30 seg, 70°C |

*En cada reacción de amplificación se utilizó la temperatura de *annealing* óptima para cada par de oligonucleótidos.

Los productos de las reacciones de secuenciación se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% desnaturizantes (acrilamida 6%, bisacrilamida 0,3%, urea 42%, TBE 0,5%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,005%) usando un gradiente de *buffer* 0,5-1 X TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). La corrida se realizó a potencia constante (50 W). Los geles se fijaron en una solución de metanol 5%, ácido acético 5% durante 20 minutos, se secaron bajo vacío a 80°C y se expusieron sobre películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) durante 24-48 hs a temperatura ambiente.

Cuando fue necesario, las reacciones de secuenciación se corrieron en geles de poliacrilamida 6% con 40 % de formamida como agente desnaturizante para impedir la formación de estructuras secundarias en las cadenas sintetizadas, que provocan distorsiones en la corrida electroforética (Martin, 1987).

En algunas autorradiografías se observó la presencia de más de una banda a la misma altura; esto imposibilita la determinación de la secuencia en esa posición y se debe a la terminación de las cadenas de ADN en forma inespecífica y no por el agregado de un dideoxinucleótido. Para superar este inconveniente, se utilizó la enzima transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT, Gibco), que es una ADN polimerasa que cataliza en ausencia de templado la adición de deoxinucleótidos al extremo 3' de ADNs de cadena simple. Una vez terminados los ciclos en el termociclador, se agregó a las reacciones 1 μ l de la siguiente mezcla: 0,48 μ l de RT/Taq buffer, 0,95 μ l de dNTPs 5mM, 2,5 μ l de agua y 0,5 μ l de TdT (5 unidades) y se incubaron las reacciones durante 30 minutos a 37°C (De Borde y col., 1986). De esta forma fue posible resolver algunas indeterminaciones.

15. Amplificación de las mutantes virales rescatadas de lesiones de bovinos

Para rescatar el virus presente en las lesiones y amplificarlo, se disgregó el tejido por machacado en mortero en presencia de 1 ml de MEM-D. Se colectó el material en un tubo y se clarificó a 5.000 rpms durante 5 minutos a 4°C. Con 500 µl del clarificado, se inocularon monocapas de células BHK-21 o monocapas de cultivo primario de RFB crecidas en frascos de 25 cm² (Falcon) y se incubaron a 37°C en estufa gaseada hasta que se observó efecto citopático (pasaje 1). Con el sobrenadante de esta infección, se infectaron nuevas monocapas de células BHK o RFB crecidas en frascos de 75 cm² (Falcon) (pasaje 2). Una vez que se observó efecto citopático, se colectó el sobrenadante y se utilizó para infectar monocapas de células BHK o RFB crecidas en botellas rotatorias (pasaje 3). A partir del sobrenadante de cada infección se extrajo ARN viral por el método de proteinasa K y se determinó la secuencia nucleotídica de la región correspondiente al sitio antigénico A, para determinar si la mutación original se mantenía luego de los pasajes en células en cultivo.

Para la mayoría de los ensayos de caracterización de las mutantes virales se utilizó el pasaje 3 proveniente de células RFB.

16. Caracterización de las variantes de escape mediante ensayos de ELISA con anticuerpos monoclonales

Se sensibilizaron placas de ELISA (Nunc Immuniplates 1 Maxisorp, Denmark) a 4°C durante toda la noche con suero de conejo hiperimmune anti VFA C3 Argentina 85 (suero de captura) diluído 1/200 en buffer carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,6 (Mulcahy y col., 1990). Todos los lavados se realizaron con PBS 1X, 0,05% Tween 20 (Sigma) y se repitieron 5 veces y las incubaciones se realizaron a 37°C en agitación constante y en volúmenes de 100µl. Las placas se lavaron y se bloquearon durante 1 hora con una solución de 5% leche descremada en buffer PBS 1X (137 mMNaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄). En los pasos subsiguientes se utilizó PBS/5% suero normal equino para diluir los reactivos y actuar como bloqueante para prevenir reacciones no específicas (Pérez Filgueiras y col., 1995). Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron durante 1 hora con una dilución adecuada de sobrenadante de células RFB infectadas con las distintas variantes, se lavaron y se agregaron diluciones seriadas al 1/10 de los anticuerpos monoclonales, comenzando de 1/10 y se incubaron durante 1

hora. Finalizada la incubación, se lavaron las placas, se agregó una dilución 1/500 de un anticuerpo antiratón conjugado a peroxidasa (KPL) y se incubó la reacción durante 1 hora. Las placas se lavaron y se revelaron mediante el agregado de ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbentiazolina-6-ácido sulfónico)] y H₂O₂ en buffer citrato pH 5. La absorbancia se midió a 405 nm y se calculó el título de cada anticuerpo monoclonal para cada variante de VFA y para el VFA utilizado en el desafío como aquella dilución de monoclonal a la cual se obtiene un 50% de absorbancia, tomando como 100% los valores de absorbancia de los diferentes virus con el anticuerpo monoclonal 7BH11. Con estos valores se calculó para cada anticuerpo monoclonal la reactividad relativa (Ri) de cada VFA variante respecto al VFA salvaje, como el cociente entre el título de la variante viral y el título del virus utilizado en el desafío para un determinado anticuerpo monoclonal. La reactividad relativa fue considerada positiva ($R_i > 0,1$), intermedia ($0,01 < R_i < 0,1$), débil ($0,001 < R_i < 0,01$) o negativa ($R_i < 0,001$), (Mateu y col., 1988).

Para llevar a cabo estos experimentos fue necesario estandarizar la cantidad de virus entero presente en los sobrenadante de células infectadas con cada variante viral para agregar cantidades equivalentes en los ensayos de ELISA. Para ello, se agregaron diluciones seriadas al 1/2 de cada variante a placas de ELISA sensibilizadas con suero de captura y bloqueadas como ya se describió. Luego de la incubación se agregó una dilución 1/100 del anticuerpo monoclonal 7BH11, que reacciona con un epitope discontinuo y conservado en los distintos serotipos de VFA y se reveló. Se eligieron las diluciones de las variantes que daban una lectura de absorbancia a 405 nm semejante y de entre 0,8 y 1. Los valores de absorbancia en ausencia de antígeno nunca fueron superiores a 0,2.

En cada placa de ELISA con los distintos anticuerpos monoclonales se incluyeron dos pocillos por variante que se revelaron con 7BH11 y que permitieron ajustar las diferentes reactividades debidas a la diferente cantidad de VFA que se agregaba a las placas.

17. Pasajes sucesivos de variantes de escape en presencia de presión inmunológica

Para determinar la dilución de suero policlonal a ser utilizada en los experimentos de presión inmune, se infectaron monocapas de células BHK-21 y de cultivos primarios de RFB con 10^3 ufp de C3 Argentina 85 (el virus utilizado en el desafío de bovinos) o de las

mutantes de escape en un volumen final de 300 μ l. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C en estufa gaseada de CO₂, se agregaron 4 ml de medio de cultivo en presencia de diluciones 1/20, 1/60, 1/200 y 1/400 y 1/800 de distintos sueros policlonales provenientes de los experimentos de vacunación de bovinos que incluyeron sueros de bovinos control (vacunados con PBS o con vacuna convencional), sueros de animales inoculados con péptidos sintéticos y protegidos frente al desafío viral y sueros de los animales no protegidos donde se generaron las diferentes mutantes de escape. Se seleccionó la dilución de suero subneutralizante que permitió obtener efecto citopático luego de 16-18 hs de incubación a 37°C. Esta dilución fue de 1/400 para la mayoría de los experimentos. Se realizaron 10 pasajes sucesivos en presencia de la dilución de suero seleccionada. El virus recuperado de un pasaje se diluyó 1/1.000 en medio de cultivo y se utilizó para infectar nuevas monocapas. En algunos casos fue necesario cambiar la dilución de suero durante el curso de los pasajes para mantener una neutralización parcial de los virus. Como control, se pasaron los distintos virus en iguales condiciones pero en ausencia de presión inmune (agregando al medio de cultivo una dilución igual de suero fetal). Luego de 10 pases seriados se extrajo el ARN de los virus recuperados, se sintetizó un ADNc, se amplificó por PCR la región del genoma viral que incluye el sitio antigénico A y se determinó la secuencia nucleotídica del mismo, que se comparó con la secuencia de este sitio en los virus originales o pasados en ausencia de presión inmune.

18. Curvas de crecimiento

Se infectaron monocapas de células BHK-21 crecidas en placas de 24 pocillos con las diferentes variantes virales a una multiplicidad de infección (moi) de 10 unidades formadoras de placa (ufp) por célula. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C en estufa gaseada para permitir la adsorción de los virus a las células y se retiró el inóculo. Las monocapas se lavaron 3 veces con medio de cultivo MEM-D pH 5,5 para eliminar el virus que no hubiera entrado a las células y luego se lavaron con medio de cultivo MEM-D pH 7,4 para restituir el pH a las células. Las células se cubrieron con 1 ml de MEM-D pH 7,4 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 50 μ g/ml de Gentamicina se incubaron en estufa gaseada a 37°C. A diferentes tiempos post infección, se colectaron alícuotas de 100 μ l del sobrenadante de infección y se restituyeron 100 μ l de medio de cultivo fresco a cada pocillo para mantener el volumen inicial. Las alícuotas colectadas se titularon en

monocapas de células BHK y se calculó el título de cada fracción colectada. La alícuota correspondiente al tiempo 0 fue la colectada luego de la hora de adsorción y correspondió al virus infeccioso remanente en las células en cultivo luego del lavado de las mismas.

19. Análisis del polimorfismo del exón II del gen DRB3 del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) bovinos por PCR-RFLP

19.1 Aislamiento de ADN de CMSP

A un volumen de la sangre colectada en presencia de anticoagulante se le agregó 1/2 volumen de NaCl 0,9% y se centrifugó a 15°C durante 10 minutos a 1.500 rpm para obtener el *buffy coat*. Se removió la interfase blanca que contiene las CMSP, se transfirió a otro tubo y se agregaron 4 ml de agua destilada, 4 ml de NaCl 1,8% y 10 ml de NaCl 0,9%, mezclando luego del agregado de cada reactivo. Se centrifugó a 15°C durante 10 minutos a 7.500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4,4 ml buffer de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10mM pH8). Luego se agregaron 50 µl de EDTA 100 mM, 50 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml y 0,5 ml de SDS 10 % y se agitó vigorosamente. Se incubó la mezcla durante 3 horas a 65 °C y luego se llevó el volumen a 10 ml con buffer de lisis y se mezcló bien. Se agregaron 5 ml de fenol saturado en agua, se mezcló, se agregaron 5 ml de cloroformo y se mezcló nuevamente. Luego se centrifugó y se colectó la fase superior a la que se le realizó una nueva extracción con fenol-cloroformo. La fase acuosa resultante se extrajo con cloroformo y luego se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El ovillo de ADN precipitado se removió utilizando una pipeta Pasteur de vidrio con la punta doblada. El ADN se resuspendió en 4,5 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8), se agregaron 0,5 ml de SSC 10X (NaCl 1,5 M, Citrato de sodio 0,15 M) y 25 µl de Rnasa 10 mg/ml y se incubó durante 1-2 horas a 37°C. Finalizada la incubación, el ADN se extrajo 2 veces con una mezcla 24:1 de cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se removió el ovillo de ADN precipitado, se escurrió el exceso de alcohol y se disolvió en 1 ml de buffer TE. Se midió la absorbancia de la muestra a 260 nm, se calculó la concentración de ADN y se preparó una dilución de trabajo de 10 ng/µl.

19.2 Amplificación del exón II del gen DRB3

La amplificación del exón II del gen DRB3 se llevó a cabo mediante 2 rondas de amplificación por PCR. En la primera ronda de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HLO30 (5'ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC3') y HLO31 (5' TTAAAT TCGCGCTCACCTCGCCGCT3') que contienen 7 y 8 nucleótidos de los extremos 5' y 3' del exón II, respectivamente y secuencias intrónicas y en la segunda ronda se utilizaron los oligonucleótidos HLO30 (utilizado en la primera ronda) y HLO32 (5' TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC 3') cuya secuencia corresponde en su totalidad a la región 3' del exón II. Los oligonucleótidos utilizados fueron los diseñados por Van Eijk y colaboradores (1992) en base a secuencias de los alelos DRB3 previamente publicadas (Groener y col., 1990 y Sigurdardóttir y col., 1991).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con 30 ng de ADN en un volumen final de 50 μ l, en presencia de 5 μ l de buffer de PCR 10x (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂), 100 μ M de cada deoxinucleótido, 0,5 μ M de cada oligonucleótido y 1,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega).

La primera ronda de amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

| | | |
|---------------------------|-------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | | 4 min, 94°C |
| 10 ciclos | desnaturalización | 1 min, 94°C |
| | <i>annealing</i> | 2 min, 60°C |
| | extensión | 1 min, 72°C |
| Extensión final | | 5 min. 72 °C |

Posteriormente se transfirieron 2 μ l de la primera amplificación a un tubo conteniendo 48 μ l de una mezcla similar a la utilizada en la primera PCR y se realizó la segunda ronda según las siguientes condiciones:

| | | |
|---------------------------|-------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | | 4 min, 94°C |
| 20 ciclos | desnaturalización | 1 min, 94°C |
| | <i>annealing</i> | 30 seg, 65°C |
| | extensión | 1 min, 72°C |
| Extensión final | | 5 min. 72 °C |

5µl de los productos de amplificación obtenidos luego de la segunda ronda se resolvieron en geles de 1% de concentración de agarosa.

El tamaño del producto de amplificación esperado fue de 284 pares de bases.

19.3 Detección de los alelos del exón II del gen DRB3

Se digirieron 13,5 µl de los productos de la segunda ronda de amplificación durante 3 horas a 37°C en presencia de 1,5 µl del buffer específico, con 5 unidades de las enzimas de restricción RsaI y HaeIII (New England Biolabs Inc.) o a 50°C con 5 unidades de la enzima de restricción BstYI (New England Biolabs Inc.), en un volumen final de 15 µl. Finalizada la incubación, los productos digeridos con BstYI se calentaron a 85 °C durante 4 minutos para desnaturalizar la enzima y obtener una mejor resolución de los productos de digestión.

Los fragmentos resultantes de la digestión con las tres enzimas de restricción se resolvieron por electroforesis en geles de 6% de concentración de poliacrilamida no desnaturalizantes (30:0,8 acrilamida:bisacrilamida, TBE 1X), corridos a 25 mA por 45 minutos. Se utilizó pBR322 digerido con MspI (New England Biolabs Inc.) y el marcador de peso molecular V (Boheringer Mannheim) como marcadores de peso molecular para la determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos. Los productos de la digestión se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (1µg/ml) y se fotografiaron en el sistema de análisis de imágenes Fotoanalyst (Fotodyne, Inc.)

A cada bovino se le asignaron los haplotipos definidos según los patrones de restricción obtenidos con las 3 enzimas antes mencionadas según fue descrito por Van Eijk y colaboradores (1992).

IV. Resultados

I. Respuesta inmune en bovinos vacunados con péptidos sintéticos

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune y la protección frente al desafío inducida en bovinos por vacurias peptídicas que representan epitopes del VFA de serotipo C3. Para ello, se utilizaron péptidos sintéticos simples y complejos que contienen epitopes para células B y T de la proteína VP1: el péptido A, que contiene el sitio antigénico A, el péptido AC que contiene los sitios antigénicos A y C y los péptidos AT y ACT que corresponden a los péptidos A y AC sintetizados colinealmente con un epitope para células T (Collen y col., 1991). Los péptidos AT y ACT se utilizaron con el fin de analizar la importancia de la inclusión de epitopes para células T en las vacunas peptídicas. Las diferentes construcciones peptídicas se utilizaron como irrimunógenos en 5 experiencias de vacunación de bovinos, en las que se evaluó la respuesta inmune humoral y celular inducida por las mismas. En estas experiencias se analizó el efecto de la dosis y de las modificaciones en los tiempos de vacunación y desafío y la importancia de las revacunaciones (*boosters*) en la respuesta inmune contra el VFA inducida por estos péptidos sintéticos. Asimismo, se evaluó la posible correlación entre la protección y diferentes parámetros inmunológicos tales como los niveles de anticuerpos neutralizantes, los índices de linfoproliferación y la seroprotección en ratón lactante

I.1 Evaluación de la respuesta inmune inducida en bovinos por diferentes dosis de péptidos sintéticos utilizando un esquema de inmunización corto

El objetivo de este primer experimento de vacunación fue evaluar la capacidad de los péptidos sintéticos **A**, **AT**, **AC** y **ACT** (Tabla 1 de Materiales y Métodos) de generar una respuesta inmune humoral y celular en bovinos. Para ello, se vacunaron 31 bovinos divididos en grupos de 3 ó 4 animales con 1 mg (dosis alta) o 0,1 mg (dosis baja) de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT, AC y ACT utilizando el esquema de inmunización corto (puntos 7.4 y 7.5 de Materiales y Métodos).

Todos los animales recibieron una dosis refuerzo (*booster*) de 0,1 mg de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT, AC y ACT a los 26 días de la primera inoculación.

Los animales se sangraron a los 26 días (antes de recibir el *booster*) y a los 46 días post-vacunación (20 días después de recibir el *booster*), se separaron los sueros y se determinaron los títulos seroneutralizantes. Los índices de linfoproliferación frente al virus (VFA) o frente a los péptidos sintéticos utilizados como irrimunógenos se evaluaron a los

46 días post-vacunación. Los resultados que se presentan en la Tabla 6 indican una clara inducción de la respuesta inmune en los animales vacunados con péptidos sintéticos y en los controles vacunados con virus inactivado.

Los resultados obtenidos con el **péptido A** muestran niveles de títulos seroneutralizantes muy bajos, independientemente de la dosis utilizada. Asimismo, no se observó efecto *booster* importante excepto en 1 de los 7 animales inoculados (animal 122). Por otra parte, los grupos inoculados con **péptido AC** mostraron una respuesta inmune humoral mayor que la obtenida con el péptido A y en particular una buena correlación dosis-respuesta así como un efecto *booster* importante. La inclusión del epítotope T al péptido A, **péptido AT**, mostró un aumento en la respuesta inmune respecto al péptido A al considerar los títulos seroneutralizantes luego de la revacunación. Sin embargo, no se observó un efecto dosis-respuesta importante. Para el **péptido ACT** se obtuvieron títulos seroneutralizantes más elevados que los obtenidos con los otros péptidos analizados, especialmente luego de la primovacunación y altos títulos seroneutralizantes luego del *booster*. Al igual que con el péptido AT, no se observó un efecto dosis-respuesta.

Al analizar los resultados de seroneutralización de los 4 grupos de péptidos se observó una variación individual importante en la respuesta inmune humoral entre individuos del mismo grupo, excepto en el grupo correspondiente al péptido ACT donde sólo 1 de 7 animales presentó títulos seroneutralizantes bajos luego de la primovacunación (animal 136).

A pesar de la alta variación individual en la respuesta inmune, se observó una tendencia al incremento de los títulos seroneutralizantes luego de la dosis refuerzo, excepto en los grupos inoculados con el péptido A. Tanto para los animales vacunados con péptidos con epítotope T (AT y ACT) como para los vacunados con el péptido AC, el efecto *booster* fue mayor al utilizar dosis de péptido bajas (0,1 mg de péptido en la primera inoculación).

Los títulos seroneutralizantes promedio a los 46 días post inoculación fueron mayores para los grupos inoculados con ACT (2,26 +/- 0,53), AC (2,05 +/- 0,57) y AT (1,9 +/- 0,37) que los obtenidos para el grupo inoculado con el péptido A (1,04 +/- 0,50).

Tabla 6: Respuesta inmune inducida por diferentes dosis de péptidos sintéticos en bovinos revacunados a los 26 dpi

| Péptido | Dosis ^a | Animal | Título SN ^b | | Índice de estimulación ^c | | | | |
|---------------|--------------------|--------|------------------------|--------|-------------------------------------|------|------|------|------|
| | | | 26 dpi | 46 dpi | VFA | A | AT | AC | ACT |
| A | Alta | 115 | 1,1 | 1,5 | N.D | N.D | | | |
| | | 118 | 0,3 | 0,5 | Neg | Neg | | | |
| | | 124 | 1,3 | SC | Neg | 7,0 | | | |
| | Baja | 134 | 0,4 | 0,6 | N.D | N.D | | | |
| | | 137 | 1,0 | SC | Neg | Neg | | | |
| | | 142 | 0,5 | 1,0 | Neg | Neg | | | |
| | | 122 | 0,3 | 1,6 | N.D | 5,9 | | | |
| | AT | Alta | 117 | 1,3 | 1,7 | 12,6 | 4,1 | N.D | |
| 128 | | | 0,7 | SC | 5,5 | 8,5 | 6,9 | | |
| 148 | | | 0,3 | 1,5 | 6,9 | 3,0 | 3,0 | | |
| Baja | | 132 | 0,6 | 1,9 | Neg | Neg | 9,3 | | |
| | | 129 | 0,4 | 1,9 | Neg | 3,6 | 3,0 | | |
| | | 120 | 0,8 | 2,5 | 5,6 | 9,2 | 18,8 | | |
| AC | Alta | 130 | 1,1 | 1,9 | Neg | 12,4 | | 16 | |
| | | 116 | 1,3 | 1,5 | Neg | Neg | | Neg | |
| | | 123 | 2,3 | 2,7 | N.D | N.D | | N.D | |
| | | 149 | 1,4 | 3,0 | Neg | Neg | | Neg | |
| | Baja | 131 | 0,6 | 1,7 | Neg | 6,5 | | 3,0 | |
| | | 138 | 0,7 | 1,7 | Neg | Neg | | Neg | |
| | | 121 | 1,2 | 2,4 | N.D | N.D | | N.D | |
| | | 126 | 0,3 | 1,5 | Neg | Neg | | Neg | |
| ACT | Alta | 150 | 1,2 | 1,5 | Neg | Neg | | | 3,5 |
| | | 136 | 0,4 | 2,2 | Neg | Neg | | | 8,0 |
| | | 140 | 1,5 | 1,7 | 5,4 | 11,4 | | | 17,2 |
| | | 127 | 2,0 | 2,7 | N.D | N.D | | | N.D |
| | Baja | 133 | 1,5 | 2,2 | 12,7 | Neg | | | 10,2 |
| | | 12 | >2,2 | 3,0 | Neg | 4,0 | | | 18,8 |
| | | 119 | 1,5 | 2,5 | Neg | 10 | | 18,9 | |
| Vacuna viral | | 146 | 2,9 | N.D | 128 | 7,2 | 8,2 | 10,7 | 5,0 |
| | | 135 | 2,2 | N.D | 12,6 | 9,5 | N.D | 6,0 | 7,3 |
| Control (PBS) | | 141 | N.D | <0,3 | Neg | Neg | Neg | Neg | Neg |

Los bovinos se inocularon con los péptidos sintéticos A, AT, AC y ACT (Tabla 1, Materiales y Métodos) y recibieron un *booster* a los 26 días post inoculación. ^a Dosis bajas: 0,1 mg de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos sintéticos más complejos en las dos inoculaciones. Dosis altas: 1 mg y 0,1 mg de péptido A o cantidades equimolares de los demás péptidos en la primera inoculación y en el *booster*, respectivamente. ^b Los títulos seroneutralizantes (SN) se expresan como la inversa del log. de la dilución de suero que reduce el número de placas al 50%. Cada valor es el promedio de por lo menos dos determinaciones. ^c Índices de estimulación correspondientes a linfocitos obtenidos a los 46 días post inoculación. Neg. Los índices de estimulación fueron inferiores a 3. N.D : no determinado. SC: Sueros contaminados.

La comparación de los índices de estimulación de las células mononucleares obtenidas a los 46 días post-vacunación (Tabla 6) mostró que los linfocitos provenientes de los animales inmunizados con los péptidos A y AC no proliferaron en respuesta al virus entero. Con el agregado del epítopo T, los linfocitos de 4 de los 6 animales inoculados con péptido AT y de 2 de los 6 animales evaluados para el péptido ACT proliferaron en respuesta al virus entero, siendo estos resultados consistentes con el reconocimiento de estos animales de epítopes para células T presentes en la partícula viral de VFA. Los índices de estimulación en respuesta a antígenos homólogos (péptidos sintéticos) mostraron que los linfocitos provenientes de 2 de los 5 animales evaluados inmunizados con péptido A y de 2 de los 6 animales evaluados para el péptido AC proliferaron en respuesta a los péptidos A y AC respectivamente, en tanto que los linfocitos provenientes de todos los animales evaluados inmunizados con los péptidos AT o ACT proliferaron en respuesta al péptido sintético utilizado para la inmunización. La proliferación de los linfocitos de animales inmunizados con los péptidos AC, AT o ACT en respuesta al péptido A fue más homogénea para los animales inmunizados con AC en cuanto a que los linfocitos de aquellos animales que proliferaron en respuesta al péptido AC lo hicieron también con el péptido A, mientras que los linfocitos de animales inmunizados con los péptidos AT y ACT mostraron un comportamiento variable, ya que algunos de los linfocitos que respondieron al péptido homólogo no lo hicieron frente al péptido A.

Todos los linfocitos provenientes de animales inmunizados con los diferentes péptidos que proliferaron en respuesta al virus entero lo hicieron también en respuesta a los péptidos testeados con una sola excepción (animal 133 vacunado con péptido ACT). Estos resultados indican que los péptidos sintéticos utilizados repiten epítopes de reconocimiento de células T que se encuentran en la partícula viral entera.

Los animales control vacunados con VFA inactivado presentaron altos títulos seroneutralizantes a los 26 días post inoculación (sangría pre *booster*), así como también altos índices de estimulación en respuesta al VFA entero y a los cuatro péptidos experimentales. Por el contrario, no se detectaron anticuerpos neutralizantes ni índices de estimulación positivos en los animales vacunados con PBS, demostrando que las respuestas de títulos seroneutralizantes y linfoproliferación son inducidas por los antígenos específicos.

Los resultados obtenidos demuestran que los péptidos A, AC, AT y ACT son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular en bovinos en las condiciones experimentales utilizadas.

I.2 Evaluación de la respuesta inmune y la protección frente al desafío en bovinos inmunizados con péptidos sintéticos utilizando un esquema de vacunación intermedio

A fin de evaluar los efectos de modificaciones en los tiempos de inmunización con péptidos sintéticos en la respuesta inmune en bovinos, se vacunaron 35 bovinos divididos en grupos de 2 a 6 bovinos con 1 mg (dosis alta) o 0,1 mg (dosis baja) del péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AC, AT y ACT siguiendo el esquema de inmunización intermedio (punto 7.4 y 7.6 de Materiales y Métodos). Luego de 35 días de haber recibido la primera inoculación los animales fueron revacunados con 0,1 mg de péptido A o cantidades equimolares de los demás péptidos sintéticos y 34 días después, se desafiaron con 10.000 dosis infectivas ratón lactante 50% (DIRL50%) de VFA C₃ Argentina 85 por inoculación intradermolingual con el fin de evaluar protección. Los títulos seroneutralizantes se determinaron a los 35 días post inoculación (sangría pre *booster*) y antes del desafío, a los 69 días post inoculación. Los índices de estimulación se evaluaron a partir de células mononucleares aisladas a los 69 días post-inoculación.

Los resultados obtenidos (Tabla 7) confirmaron una variación individual considerable en la respuesta inmune observada y una tendencia al aumento de los títulos seroneutralizantes luego del *booster* en todos los grupos de animales. Nuevamente, no se observó correlación dosis-respuesta para ninguno de los péptidos.

Los títulos seroneutralizantes promedio obtenidos a los 69 días después de la primera inmunización fueron 2,55 (+/- 0,53) para AT, 2,33 (+/- 0,53) para A, 2,33 (+/- 0,44) para ACT y 1,76 (+/- 0,36) para el péptido AC.

La protección alcanzada frente al desafío viral fue del 50% (3/6 animales protegidos) en los animales vacunados con péptido A, del 33% (3/9 animales protegidos) en el grupo vacunado con el péptido AT y del 25 % (2/8 animales protegidos) para los animales vacunados con los péptidos AC y ACT. Todos los animales inoculados con virus inactivado se protegieron frente al desafío viral y los placebos, vacunados con PBS, presentaron lesiones en las 4 patas a los 4 días post-desafío.

En general, todos los animales que resultaron protegidos frente al desafío viral presentaron títulos seroneutralizantes altos; sin embargo, no todos los animales con títulos seroneutralizantes altos resultaron protegidos.

Tabla 7: Respuesta inmune y protección inducida por diferentes dosis de péptidos sintéticos en bovinos revacunados a los 35 y desafiados a los 69 dpi

| Péptido | Dosis ^a | Animal | Título SN ^b | | Índice de estimulación contra VFA ^c | Protección ^d |
|---------------|--------------------|--------------|------------------------|--------|--|-------------------------|
| | | | 35 dpi | 69 dpi | | |
| A | Alta | 67 | 1,9 | 3,0 | 10 | + |
| | | 68 | 1,3 | 1,7 | Neg | - |
| | | 69 | 2,1 | 2,8 | 31 | |
| | Baja | 64 | 1,9 | 2,0 | N.D | |
| | | 65 | 1,9 | 2,6 | 11 | |
| | | 66 | 1,8 | 1,9 | Neg | - |
| AT | Alta | 76 | 1,2 | 2,2 | 27 | + |
| | | 77 | 2,2 | 3,2 | Neg | - |
| | | 78 | 1,7 | 3,1 | 17 | - |
| | Baja | 70 | 2,8 | 2,7 | N.D | |
| | | 71 | <0,7 | 2,5 | 20 | |
| | | 72 | 1,1 | 2,6 | Neg | |
| | | 73 | 1,6 | 2,6 | 24 | |
| | | 74 | 1,8 | 2,7 | N.D | |
| | | 75 | 0,7 | 1,4 | Neg | - |
| AC | Alta | 85 | 1,9 | 1,1 | N.D | - |
| | | 86 | 1,7 | 2,0 | Neg | - |
| | | 87 | 1,0 | 2,2 | 46 | - |
| | Baja | 79 | 0,7 | 1,6 | Neg | |
| | | 80 | SC | SC | 13 | |
| | | 82 | N.D | 2,0 | N.D | - |
| | | 83 | 1,3 | 1,6 | Neg | - |
| | | 84 | 1,5 | 1,8 | 6 | + |
| ACT | Alta | 99 | <0,7 | 2,8 | 42 | - |
| | | 101 | 1,0 | 2,7 | 14 | - |
| | Baja | 92 | 0,9 | 1,8 | 252 | |
| | | 93 | 1,1 | 2,3 | N.D | |
| | | 94 | <0,7 | 2,3 | 28 | |
| | | 95 | <0,7 | N.D | 55 | |
| | | 96 | 2,4 | 2,7 | N.D | |
| | | 97 | <0,7 | 1,7 | N.D | - |
| | | Vacuna viral | 98 | >2,6 | >3,0 | 24 |
| 107 | 1,6 | | >3,0 | 27 | + | |
| Control (PBS) | 105 | <0,7 | <0,7 | Neg | - | |
| | 106 | <0,7 | <0,7 | Neg | - | |

Los bovinos se inocularon con los péptidos sintéticos A, AT, AC y ACT (Tabla 1, Materiales y Métodos). ^a Dosis bajas y altas corresponden a las descritas en la Tabla 6. ^b Los títulos seroneutralizantes (SN) se expresan como la inversa del log. de la dilución de suero que reduce el número de placas al 50%. Cada valor es el promedio de por lo menos dos determinaciones. ^c Índices de estimulación correspondientes a linfocitos obtenidos a los 69 días post inoculación. Neg. Los índices de estimulación fueron inferiores a 3. N.D : no determinado. ^d + indica los animales protegidos y - indica los animales que presentaron lesiones en por lo menos una de sus patas a los 7 días post desafío. SC: suero contaminado.

El análisis de los índices de estimulación obtenidos mostró que los linfocitos de todos los animales inoculados con el péptido ACT y evaluados en este ensayo proliferaron en respuesta al virus entero pero sólo 2 de ellos resultaron protegidos frente al desafío viral. A diferencia de lo observado en la experiencia anterior donde los linfocitos de los animales inoculados con los péptidos A y AC no proliferaron en respuesta al VFA, en esta experiencia los linfocitos de 3 de 5 animales inoculados con péptido A proliferaron en respuesta al VFA y estos 3 animales resultaron protegidos, en tanto que de los 3 animales inoculados con péptido AC que presentaron índices de estimulación positivos, 2 de ellos resultaron protegidos al desafío viral. Para el péptido AT, los índices de estimulación de 4 de 7 animales ensayados fueron positivos y sólo 1 de ellos resultó protegido.

Los linfocitos de los animales protegidos proliferaron en respuesta al VFA entero pero no todos aquellos animales que presentaron índices de estimulación positivos frente al VFA resultaron protegidos.

No se observó una correlación entre títulos seroneutralizantes o índices linfoproliferación y protección. Índices de estimulación semejantes a los obtenidos en los animales vacunados con virus inactivado no garantizaron protección en animales vacunados con péptidos sintéticos.

Los animales control vacunados con VFA inactivado mostraron altos títulos seroneutralizantes a los 69 días post inoculación, altos índices de estimulación en respuesta al VFA entero y resultaron protegidos frente al desafío viral. Los animales placebo (vacunados con PBS) no mostraron títulos seroneutralizantes detectables ni presentaron índices de estimulación positivos en respuesta al VFA y presentaron lesiones luego del desafío viral.

La comparación de los títulos seroneutralizantes promedio post *booster* del primer experimento respecto del segundo sugiere que la respuesta de anticuerpos neutralizantes montada en los animales inoculados con el péptido ACT resultó menos afectada por la variación de los tiempos de vacunación que aquellas inducidas por los demás péptidos evaluados. Por otro lado, los datos mostraron una tendencia del péptido A a inducir títulos seroneutralizantes mayores cuando el intervalo de tiempo entre la primera inoculación y el *booster* y entre el *booster* y el desafío fue mayor.

Con respecto a los índices de linfoproliferación frente al VFA, la variación en los tiempos de vacunación no tuvo un efecto importante en los animales inoculados con péptidos que contienen el epítipo T (péptidos AT y ACT). Sin embargo, a diferencia de lo observado en el primer experimento donde los índices de linfoproliferación fueron negativos para

todos los animales vacunados con los péptidos A y AC, en el segundo experimento algunos animales vacunados con estos péptidos mostraron índices de estimulación positivos.

Independientemente de la dosis utilizada para los péptidos AT, AC y ACT, cuando hubo una baja inducción de anticuerpos seroneutralizantes en la primovacunación, se observó un efecto *booster* más importante. Por otra parte, el efecto dosis tuvo menor importancia cuando se analizó la respuesta post *booster*.

A partir de los datos obtenidos en estos dos experimentos de vacunación, se observa que la vacunación con péptidos sintéticos permite proteger bovinos frente al desafío viral.

1.3 Evaluación de la protección en bovinos conferida por los péptidos A, AT y ACT siguiendo el esquema de inmunización corto

Debido a la baja reproducibilidad de los resultados obtenidos con los diferentes esquemas de vacunación, se realizó un tercer experimento con los péptidos A, AT y ACT siguiendo un protocolo de vacunación similar al utilizado en la primera experiencia (esquema corto, *booster* a los 26 días de la primera inoculación y desafío a los 46 (puntos 7.4 y 7.7 de Materiales y Métodos).

A fin de simplificar los experimentos de vacunación y disminuir el número de variables a analizar, las experiencias siguientes se desarrollaron utilizando una única dosis de péptido.

Grupos de 10 animales se vacunaron con una dosis alta de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT y ACT, tanto en la primera inoculación como en el *booster*. A los 46 días de la primera inoculación (antes de que los animales fueran desafiados) se determinaron los títulos seroneutralizantes y los índices de linfoproliferación. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla 8.

Los títulos seroneutralizantes promedio post *booster* obtenidos en los sueros de los animales inmunizados con los péptidos AT (2,36 +/- 0,22) y ACT (2,33 +/- 0,21) fueron similares a los observados para estos mismos péptidos en el primer experimento (1,9 +/- 0,37) y (2,26 +/- 0,53), respectivamente. Sin embargo, los títulos seroneutralizantes obtenidos en los sueros de los animales vacunados con péptido A (1,82 +/- 0,56) fueron más altos que aquellos obtenidos en el primer experimento (1,04 +/- 0,50). Los animales vacunados con el péptido A mostraron en general títulos seroneutralizantes menores y mayor variación individual que los vacunados con AT o ACT.

Los mayores porcentajes de protección frente al desafío viral se obtuvieron con el péptido ACT (40%), seguido por el péptido AT (30%) y el péptido A (20%). Al igual que en el experimento anterior, no fue posible establecer una correlación entre el título seroneutralizante y la protección frente al desafío con virus infeccioso. Tal como se observó en las experiencias anteriores, todos los animales protegidos presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes >2 ; sin embargo, no todos los animales con títulos seroneutralizantes >2 resultaron protegidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en experimentos de vacunación de bovinos con péptidos sintéticos correspondientes a secuencias del VFA de serotipo O1 Kaufbeuren (DiMarchi y col., 1986). Los animales control inoculados con PBS no produjeron anticuerpos neutralizantes ni resultaron protegidos al desafío viral, y los que recibieron la vacuna convencional presentaron altos títulos seroneutralizantes. Sin embargo, en este experimento uno de los animales inoculados con virus inactivado (animal 34) presentó lesiones leves luego del desafío viral, aunque no fue posible detectar ARN específico de VFA por RT-PCR en 3 intentos independientes, ni detectar virus infeccioso luego de 6 pasajes ciegos a partir de material de las lesiones aisladas de este animal. Además, el animal 34 presentó signos de enfermedad (mucus o queloides y falta de apetito) en los días previos al inicio del experimento.

Mulcahy y colaboradores (1991) mostraron que los ensayos de seroprotección en ratón lactante correlacionaban mejor que los títulos seroneutralizantes con la protección alcanzada en bovinos y animales experimentales vacunados con péptidos sintéticos. Debido a que en las experiencias realizadas no fue posible correlacionar protección frente al desafío con título de anticuerpos neutralizantes, se determinó la DPRL 50%, con el objeto de evaluar si este parámetro inmunológico correlacionaba mejor con la protección en bovinos.

En los animales vacunados con los péptidos A y AT esta correlación fue baja. Sin embargo, 4 de los 5 animales vacunados con el péptido ACT que presentaron altos valores de DPRL 50% ($> 4,8$) resultaron protegidos frente al desafío viral.

Tabla 8: Respuesta inmune y protección inducida por los péptidos sintéticos A, AT y ACT en bovinos revacunados a los 26 dpi y desafiados a los 46 dpi

| Péptido | Animal | Título SN ^a | DPRL50% ^b | Índice de ^c estimulación | Protección ^d | |
|--------------|--------|------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|---|
| A | 1 | 1,2 | 1,4 | Neg | - | |
| | 2 | 2,0 | 3,2 | N.D | - | |
| | 3 | 1,5 | 1,7 | Neg | - | |
| | 4 | 2,1 | 3,7 | N.D | - | |
| | 5 | 1,4 | 2,4 | 3 | - | |
| | 6 | 2,0 | >3,9 | Neg | - | |
| | 7 | 0,9 | <0,9 | Neg | - | |
| | 8 | 2,1 | 1,8 | 4 | - | |
| | 9 | 2,8 | 3,8 | Neg | - | |
| | 12 | 2,2 | 3,8 | | + | |
| | AT | 10 | 2,5 | 3,0 | | - |
| | | 11 | 2,5 | 2,7 | | - |
| 13 | | 2,3 | 2,7 | | - | |
| 14 | | 2,5 | 1,8 | | - | |
| 15 | | 2,4 | 1,7 | | - | |
| 16 | | >2,7 | >3,7 | | - | |
| 17 | | 1,9 | 3,0 | | - | |
| 18 | | 2,2 | >3,7 | | - | |
| 19 | | 2,4 | 1,8 | | - | |
| 21 | | 2,2 | 2,6 | 4 | - | |
| ACT | 23 | 2,5 | >4,8 | | + | |
| | 24 | 2,6 | >4,8 | | + | |
| | 25 | 2,3 | 2,9 | | - | |
| | 26 | 2,2 | N.D | | - | |
| | 32 | 2,4 | 2,5 | | - | |
| | 33 | 2,3 | >4,8 | | - | |
| | 35 | 2,2 | 2,1 | | - | |
| | 39 | 1,9 | 2,8 | | - | |
| | 40 | 2,6 | >4,8 | | - | |
| | 47 | 2,3 | >4,8 | | + | |
| Vacuna viral | 29 | 3,1 | >4,8 | | + | |
| | 34 | 3,1 | N.D | | - | |
| | 37 | 3,2 | N.D | | + | |
| PBS | 27 | <0,9 | N.D | | - | |

Los bovinos se inocularon con una dosis alta de péptido A o cantidades equimolares de los péptidos AT y ACT (Tabla 1, Materiales y Métodos), en la primera inoculación y en el *booster*. ^a Los títulos seroneutralizantes (SN) se expresan como la inversa del log. de la dilución de suero que reduce el número de placas al 50%. Los valores corresponden a los sueros extraídos a los 46 dpi y son el promedio de por lo menos dos determinaciones. ^b Dosis protectora 50% ratón lactante de los sueros obtenidos a los 46 dpi, calculada como la diferencia entre el título del virus y el título del suero + virus. ^c Índices de estimulación correspondientes a linfocitos obtenidos a los 46 dpi. Neg. Los índices de estimulación fueron inferiores a 3. ^d Los animales se desafiaron a los 46 dpi. + indica los animales protegidos y - indica los animales que presentaron lesiones en por lo menos una de sus patas a los 7 días post desafío. N.D : no determinado

Otro parámetro inmunológico que puede correlacionar con protección es la relación entre IgG1 e IgG2 (Mulcahy y col., 1990). Por esta razón, en esta experiencia se evaluó la cantidad relativa de IgG1 respecto de IgG2 presente en los sueros post *booster* de los bovinos experimentales. En los animales inoculados con péptidos sintéticos los cocientes IgG1/IgG2 fueron superiores a aquellos obtenidos en los animales vacunados con virus inactivado. Estas diferencias fueron más notoria en los sueros de los animales inoculados con péptido A y se debió principalmente a la disminución de los títulos de IgG2. Estas diferencias fueron menores en los animales vacunados con los péptidos AT o ACT (Datos no mostrados, Dr. Sobrino, comunicación personal).

En esta experiencia sólo se realizaron ensayos de linfoproliferación para algunos de los animales inoculados con péptido A y de los 2 animales analizados que presentaron índices de estimulación positivos sólo 1 resultó protegido.

Con este esquema de vacunación, también fue posible proteger bovinos vacunados con péptidos sintéticos frente al desafío viral obteniéndose los mayores niveles de protección al utilizar el péptido ACT.

El diseño de los péptidos utilizados en este trabajo se basó en secuencias del virus C3 Argentina 85 anteriormente publicadas (Piccone y col. 1988 y Martínez y col. 1991). Sin embargo, durante los experimentos de vacunación y desafío anteriormente descritos se utilizó VFA C3 Argentina 85 clonado 3 veces en células BHK-21. La secuencia aminoacídica del clón utilizado presenta una sustitución aminoacídica en la posición 139 de VP1 (A (139)→ V) respecto de la secuencia de los péptidos diseñados (Tabla 1 de Materiales y Métodos). Para analizar si este cambio afectaba los resultados de protección obtenidos en las experiencias anteriores, se repitió un experimento siguiendo el esquema de inmunización corto (puntos 7.4 y 7.8 de Materiales y Métodos), utilizando péptidos con la sustitución A (139)→ V, que se denominaron A*, AT* y ACT*.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla 9. En la misma se incluyeron los datos correspondientes a animales vacunados con el péptido A* que corresponden a la experiencia 5, a fin de comparar los resultados obtenidos con los péptidos AT* y ACT*.

La comparación de los títulos seroneutralizantes promedio obtenidos luego del *booster* (día 46) en los animales vacunados con los péptidos A* (1,6 +/- 0,48), AT* (2,55 +/- 0,32) y ACT* (2,62 +/- 0,31) que contienen valina en la posición 139 respecto de los obtenidos para los péptidos A (1,82 +/- 0,56), AT (2,36 +/- 0,22) y ACT (2,33 +/- 0,21) que contienen

alanina en la posición 139, permitió determinar que no existen diferencias significativas en el nivel de anticuerpos seroneutralizantes inducido por ambos grupos de péptidos. Nuevamente, se observaron títulos seroneutralizantes menores y mayor variación individual en los animales vacunados con el péptido A* respecto de los vacunados con AT* o ACT*.

Tabla 9: Respuesta inmune y protección inducida por los péptidos sintéticos A*, AT* y ACT* en bovinos revacunados a los 26 dpi y desafiados a los 46 dpi

| Péptido | Animal | Título SN ^a | DPRL50% ^b | Protección ^c |
|---------------|--------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| A* | 857 | 1,7 | 3,8 | - |
| | 858 | 2,1 | >3,9 | - |
| | 859 | 0,8 | <0,9 | - |
| | 860 | N.D | 1,6 | - |
| | 861 | 1,7 | 3,4 | - |
| | 862 | 1,7 | >3,9 | - |
| AT* | L7 | 2,8 | N.D | + |
| | L8 | 2,6 | N.D | - |
| | L9 | 2,8 | N.D | - |
| | L10 | 2,1 | N.D | - |
| | L11 | 2,2 | N.D | - |
| | L12 | >2,8 | N.D | - |
| ACT* | L1 | 2,7 | N.D | + |
| | L2 | >3,0 | N.D | + |
| | L3 | 2,3 | N.D | - |
| | L4 | >2,8 | N.D | - |
| | L5 | 2,3 | N.D | - |
| Vacuna virai | 1.1 | >3,0 | N.D | + |
| | 1.2 | N.D | N.D | + |
| PBS (control) | 1.3 | <0,9 | N.D | - |
| | 1.4 | <0,9 | N.D | - |

Los bovinos se inocularon con una dosis alta del péptido A* o cantidades equimolares de los péptidos AT* y ACT* (Tabla 1, Materiales y Métodos) en la primera inoculación y en el *booster*. ^a Los títulos seroneutralizantes (SN) 50% corresponden a los sueros extraídos a los 46 dpi y son el promedio de por lo menos dos determinaciones. ^b Dosis protectora 50% ratón lactante de los sueros obtenidos a los 46 dpi, calculada como en la Tabla 8. ^c Los animales se desafiaron a los 46 dpi. + indica los animales protegidos y - indica los animales que presentaron lesiones en por lo menos una de sus patas a los 7 días post desafío. N.D : no determinado

Al igual que en el experimento anterior, el mayor porcentaje de protección se obtuvo en los bovinos vacunados con ACT* (60%), seguido por AT* (16,7%). Ninguno de los bovinos vacunados con A* resultó protegido al desafío. Nuevamente, el análisis de los títulos seroneutralizantes y los niveles de protección, no permitió establecer una correlación entre estos parámetros. Los animales control vacunados con VFA inactivado presentaron títulos seroneutralizantes altos y 100 % de protección al desafío y en los sueros de los animales control vacunados con PBS no se detectaron anticuerpos neutralizantes y desarrollaron lesiones luego del desafío viral.

Al igual que en el experimento anterior, la relación IgG1/IgG2 de los sueros provenientes de animales inoculados con péptido A* fue, en promedio, superior a los cocientes obtenidos para los animales vacunados con virus inactivado. Estas diferencias fueron menores en los animales vacunados con los péptidos AT* o ACT* (Dr. Sobrino, comunicación personal).

Los resultados obtenidos en este experimento indicaron que la sustitución A (139)→ V no afectó la respuesta inmune ni la protección alcanzada en los experimentos de vacunación anteriores.

Los valores de protección global obtenidos en estos dos experimentos fueron del 47% para el péptido ACT, 25% para el péptido AT y del 12% para el péptido A.

I.4 Efecto de diferentes esquemas de vacunación en la respuesta inmune y protección conferidas por el péptido A

Los datos de seroneutralización obtenidos en los sueros de los animales vacunados con el péptido A así como los niveles de protección frente al desafío viral alcanzados, fueron los que mostraron mayor variación individual en los experimentos de vacunación realizados. Estas diferencias podrían sugerir que los esquemas de inmunización afectan principalmente al péptido A. Para confirmar la influencia de los diferentes esquemas de vacunación en la inducción de respuesta inmune y optimizar un protocolo de inmunización, se llevó a cabo un nuevo experimento de vacunación con el péptido A* evaluando distintos tiempos de revacunación y desafío. Se vacunaron grupos de 6 animales con dosis alta de péptido A* siguiendo un protocolo de inmunización corto (*booster* a los 26 días y desafío a los 46 días de la primera inoculación), intermedio (*booster* a los 35 días y desafío a los 69 días de la primera inoculación) o largo (*booster* a los 96 días y desafío a los 138 días de la primera inoculación). Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Efecto de diferentes esquemas de vacunación en la respuesta inmune y protección conferidas en bovinos por el péptido A

| Esquema de inmunización ^a | | Animal | TSN ^b | DPRL50 ^c | Protección ^d | |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------------|---|
| CORTO | Dosis refuerzo, 26 dpi | 857 | 1,7 | 3,8 | | |
| | | 858 | 2,1 | >3,9 | | |
| | | 859 | 0,8 | <0,9 | | |
| | | Desafío, 46 dpi | 860 | N.D | 1,6 | |
| | | | 861 | 1,7 | 3,4 | |
| | | | 862 | 1,7 | >3,9 | |
| | Vacuna viral | 873 | 3,5 | N.D | + | |
| INTERMEDIO | Dosis refuerzo, 35 dpi | 851 | 3 | 3,7 | - | |
| | | 852 | 1,3 | 2,9 | - | |
| | | 853 | 3 | >2,8 | - | |
| | | Desafío, 69 dpi | 854 | 2,3 | >3,8 | - |
| | | | 855 | 1,2 | 1,3 | - |
| | | | 856 | N.D | N.D | + |
| | Vacuna viral | 871 | 3,5 | >3,8 | + | |
| PBS (control) | 874 | N.D | N.D | - | | |
| LARGO | Dosis refuerzo, 96 dpi | 863 | 1,4 | 1 | | |
| | | 864 | 2,8 | 2,6 | | |
| | | 865 | 3,3 | >3,9 | | |
| | | Desafío, 138 dpi | 866 | 2,5 | >3,9 | |
| | | | 868 | 1,2 | 1 | - |
| | | | 869 | 2,8 | 1,4 | - |
| | Vacuna viral | 867 | 3,4 | >2,8 | + | |
| 870 | | 2,6 | >2,8 | + | | |
| PBS (control) | 872 | N.D | N.D | - | | |

^a Los bovinos se inocularon con una dosis alta de péptido A* en la primera inoculación (día 0) y en el *booster*. ^b Los títulos seroneutralizantes 50% (TSN) se calcularon con los sueros obtenidos previos al desafío y son el promedio de por lo menos dos determinaciones. ^c Dosis protectora 50% en ratón lactante determinada con los sueros previos al desafío. ^d Los animales se desafiaron en los tiempos indicados para cada esquema de inmunización. + indica los animales protegidos y - indica los animales que presentaron lesiones en por lo menos una de sus patas a los 7 días post desafío. N.D : no determinado. El bovino 874 vacunado con PBS fue compartido por los esquemas de vacunación corto e intermedio.

Al igual que en todos los experimentos anteriores, se observó una considerable variación individual en la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Los títulos seroneutralizantes promedio *post booster* obtenidos en los animales que siguieron el esquema de

inmunización corto (1,6 +/- 0,48) fueron menores que los observados en los esquemas de inmunización intermedio (2,16 +/- 0,88) y largo (2,33 +/- 0,84). Esto correlaciona con lo observado en experimentos anteriores (Tablas 6, 7, 8 y 9). Sin embargo, a pesar del aumento en los títulos seroneutralizantes con los tiempos de vacunación y desafío mayores, los niveles de protección no aumentaron significativamente. La protección obtenida fue nula o muy baja.

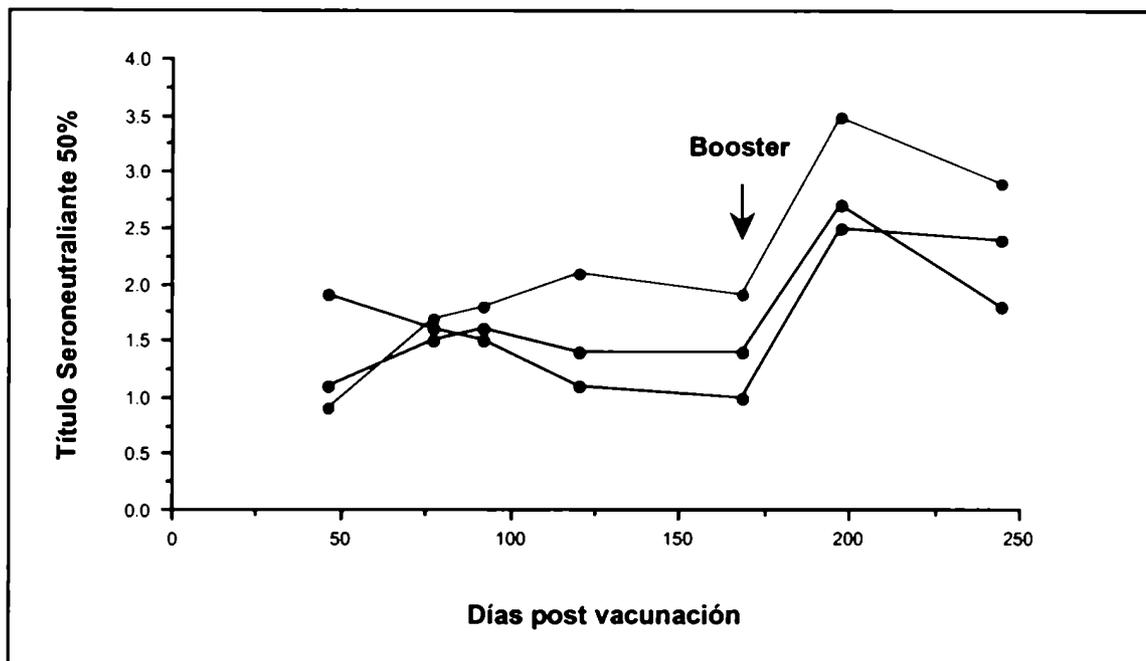
Al igual que en los experimentos anteriores, no se observó correlación entre la DPRL50% ratón lactante y la protección en bovinos inoculados con péptido A*.

A fin de evaluar la cinética de anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados con péptido A, se vacunaron 3 animales (de caravana número 20, 22 y 31) con 2 mg de péptido A* y a los 168 días post inoculación se los revacunó. Los títulos seroneutralizantes se determinaron a los 46, 77, 92, 120, 168, 197 y 245 días post inoculación. Los resultados (Figura 5) confirmaron la alta variabilidad en la respuesta individual al utilizar el péptido A como inmunógeno, ya que se observaron diferencias importantes en los valores de los títulos seroneutralizantes de los 3 animales a lo largo de toda la experiencia.

Si bien la cinética de anticuerpos neutralizantes fue variable, en los 3 animales se mantuvo un nivel de anticuerpos neutralizantes detectable hasta los 168 días post inoculación. Además, en todos los casos se observó efecto *booster*.

Los datos obtenidos en los diferentes experimentos de vacunación indican que al utilizar el péptido A como inmunógeno se obtienen títulos seroneutralizantes más elevados con protocolos de vacunación más largos.

Figura 5: Cinética de anticuerpos neutralizantes en bovinos vacunados con péptido A*



Se vacunaron 3 bovinos con una dosis alta de péptido A* (día 0) y a diferentes dpi se separaron los sueros y se calcularon los títulos seroneutralizantes 50% como el log. de la dilución de suero que reduce el número de placas al 50%. A los 168 dpi los bovinos recibieron un booster de 2 mg de péptido A*. ● suero de animal 20, ● suero de animal 22, ● suero de animal 31. La figura 5 es representativa de 2 experimentos independientes donde se observaron los mismos perfiles de reactividad.

En la Tabla 11 se resumen los resultados de títulos seroneutralizantes y porcentajes de protección obtenidos para los grupos de bovinos vacunados con cada uno de los péptidos sintéticos evaluados en los 4 experimentos de vacunación. De los mismos se desprende la alta variación tanto en la respuesta inmune humoral como en los niveles de protección observados a lo largo de todos los experimentos, especialmente en los bovinos vacunados con péptido A. Los valores de los títulos seroneutralizantes de los animales vacunados con péptidos que contienen el epítipo T se mantuvo más constante en los distintos experimentos, especialmente los observados en los bovinos vacunados con el péptido más complejo ACT. Sin embargo, no fue posible establecer una correlación entre los niveles de anticuerpos seroneutralizantes y la protección para ninguno de los péptidos evaluados.

Tabla 11: Resumen de los resultados de títulos seroneutralizantes (TSN) y porcentajes de protección obtenidos en los 4 experimentos de vacunación en los grupos de bovinos vacunados con cada uno de los péptidos sintéticos evaluados

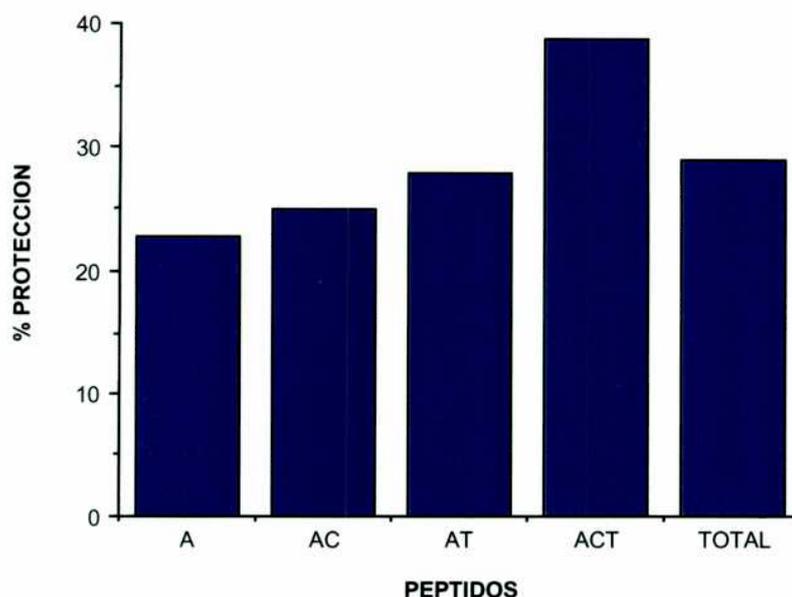
| Péptido | Experiencia de vacunación ^a | | | | | | | |
|------------|--|------------|----------------|------------|----------------|------------|---------------------|------------|
| | Primera | | Segunda | | Tercera | | Cuarta ^b | |
| | TSN | Protección | TSN | Protección | TSN | Protección | TSN | Protección |
| A | 1,04 ± 0,5 | N.D | 2,33 ± 0,53 | 50% | 1,82 ± 0,56 | 20% | 1,6 ± 0,48 | 0% |
| AC | 2,05 ± 0,57 | N.D | 1,76 ± 0,36 | 25% | N.D | N.D | N.D | N.D |
| AT | 1,9 ± 0,37 | N.D | 2,55 ± 0,53 | 33% | 2,36 ± 0,22 | 30% | 2,55 ± 0,32 | 16,7% |
| ACT | 2,26 ± 0,53 | N.D | 2,33 ± 0,44 | 25% | 2,33 ± 0,21 | 40% | 2,62 ± 0,31 | 60% |

^a Los bovinos se vacunaron en las condiciones descritas para cada experimento (Tablas 6 a 9).

^b En esta experiencia se utilizaron los péptidos A*, AT* y ACT*. N.D: no determinado.

Del conjunto de datos obtenidos en todos los experimentos de vacunación (Tablas 7 a 10) en los que se inmunizaron un total de 90 bovinos, se observó que los niveles de protección global que se alcanzaron fueron del 29% al utilizar en el desafío viral 10.000 DIRL50% por inoculación intradermolingual. Los mayores niveles de protección parcial se obtuvieron cuando se inmunizó el péptido ACT (39% de protección) seguido por AT (28% de protección), AC (25 % de protección) y por último A (23% de protección). Los datos de protección se muestran en la Figura 6.

Figura 6: Resumen de la protección obtenida al inmunizar bovinos con péptidos sintéticos derivados del VFA



| Péptido ^a | Animales protegidos / desafiados ^b | % de protección ^c |
|----------------------|---|------------------------------|
| A | 8 / 34 | 23 |
| AC | 2 / 8 | 25 |
| AT | 7 / 25 | 28 |
| ACT | 9 / 23 | 39 |
| Total | 26 / 90 | 29 |

^a Se inocularon un total de 90 bovinos con diferentes péptidos sintéticos que incluyen secuencias de la proteína VP1 del VFA C3 Arg85 (Tabla 1, Materiales y Métodos). ^b Número de animales protegidos frente al desafío respecto del total de animales inoculados con un determinado péptido sintético. ^c Porcentaje de protección al desafío viral (10.000 D1RL50%) observada en los animales inoculados con cada uno de los péptidos sintéticos y en los diferentes experimentos.

I.5 Análisis de la influencia del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) bovino en la respuesta a los péptidos sintéticos

El conjunto de resultados obtenidos en los experimentos de vacunación de bovinos con péptidos sintéticos (Tabla 11 y Figura 6) mostró que los niveles de protección alcanzados fueron, en promedio, del 29%. Además, se encontró una correlación limitada entre la protección y los diferentes parámetros inmunológicos analizados. Si bien gran parte de los

bovinos desarrollaron títulos altos de anticuerpos neutralizantes específicos contra el VFA, las respuestas inducidas mostraron una variación individual importante que podría reflejar el polimorfismo de los alelos del CMH clase II de los bovinos, involucrado en la presentación antigénica de los péptidos a las células T.

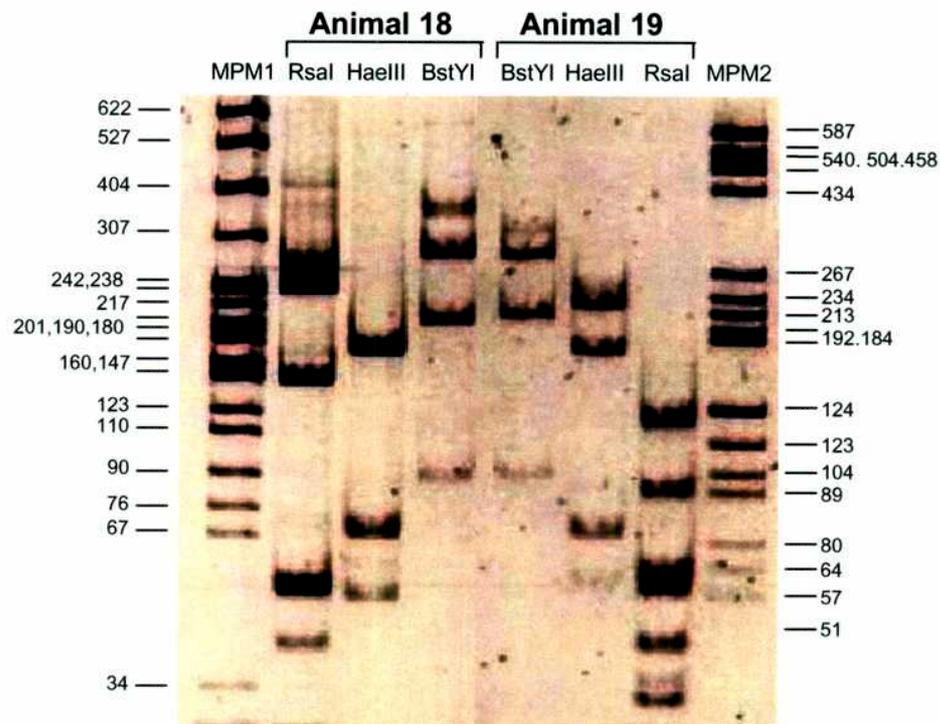
Con el objeto de evaluar el rol de los genes del CMH clase II bovino en la respuesta individual observada, se analizó el polimorfismo del locus DRB3 de los animales inmunizados con las vacunas peptídicas. Se utilizó el gen DRB3 para este análisis debido a que codifica para una molécula de superficie, altamente polimórfica que contribuye al control de la presentación antigénica del péptido A del VFA de serotipo O en bovinos individuales (Glass y col., 1992, 1994). El análisis se realizó mediante amplificación por PCR del exón II del gen DRB3 seguida de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) a partir de ADN extraído de CMSP de los bovinos inoculados con péptidos sintéticos. El criterio y nomenclatura utilizados para la tipificación del gen DRB3 se basó en lo propuesto por Van Eijk y colaboradores (1992).

En la Figura 7 se muestra a modo de ejemplo, el gel de poliacrilamida de los patrones de restricción obtenidos con las enzimas RsaI, HaeIII y BstYI del fragmento de ADN resultante de amplificar por PCR el exón II del gen DRB3 de los animales 18 y 19 y la asignación de alelos resultante de los mismos.

Para un grupo de 46 bovinos vacunados con los péptidos A, AT o ACT, se analizó la asociación de los alelos asignados al locus DRB3 con la respuesta de anticuerpos neutralizantes y la protección frente al desafío viral (Tablas 8 a 10). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

A partir de los datos mostrados en la Tabla 12, no se observó una correlación consistente entre la composición de alelos del locus DRB3 y la protección conferida por los distintos péptidos sintéticos frente al desafío viral. Excepto los alelos 24 y 3701 que fueron detectados en un animal protegido cada uno, ningún alelo del locus DRB3 se encontró diferencialmente en los animales protegidos. Del mismo modo, no se encontró correlación entre los demás parámetros inmunológicos evaluados y la composición de alelos del locus DRB3.

Figura 7: Determinación de los alelos del gen DRB3 del CMH clase II a partir de los ADN extraídos de los bovinos inoculados con péptidos sintéticos



| Animal N° | Patrones de restricción | | | Alelo DRB3.2 |
|-----------|-------------------------|-------|--------|--------------|
| | RsaI | BstYI | HaeIII | |
| 18 | l | b | f | 18 |
| | e | c | c | 17 |
| 19 | a | a | a | 1 |
| | b | b | b | 3 |

El ADN extraído de las CMSP de los bovinos inoculados con péptidos sintéticos sirvió de templado para amplificar el exón II del gen DRB3 mediante dos rondas de PCR. El producto de amplificación se digirió con las enzimas de restricción RsaI, HaeIII y BstYI y los productos resultantes se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% no desnaturalizantes que se tiñeron con bromuro de etidio. MPM1: pBR322 digerido con MspI (NEB, Inc.), MPM2: Marcador de peso molecular V (Boehringer Mannheim). En la figura se muestran las bandas de ADN obtenidas al utilizar ADN proveniente de los animales 18 y 19 vacunados con péptido AT (Tabla 8 de Resultados) y los alelos asignados de acuerdo a los patrones de restricción obtenidos con las enzimas RsaI, HaeIII y BstYI. El criterio y nomenclatura para la tipificación del locus DRB3 se basó en el propuesto por Van Eijk y colaboradores (1992).

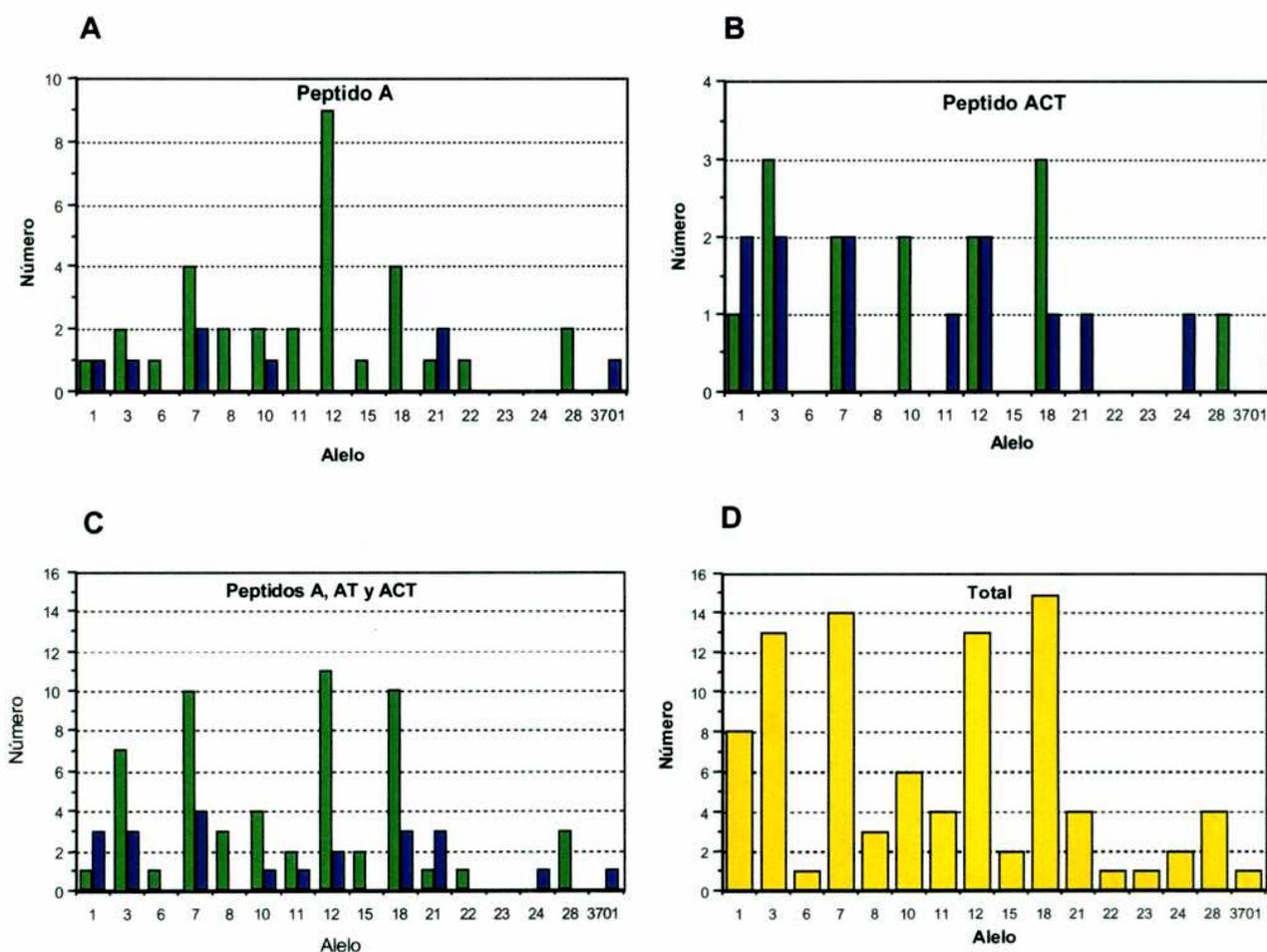
Tabla 12: Tipificación de los alelos del gen DRB3 del CMH clase II de bovinos inmunizados con péptidos sintéticos y su correlación con parámetros inmunológicos.

| Péptido ^a | Animal | Protección ^b | Alelo del locus DRB3 ^c | TSN 50% ^d |
|----------------------|--------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| A | 856 | + | 1, 3701 | N.D. |
| | 864 | + | 3, 21 | 2,8 |
| | 866 | + | 7, 10 | 2,5 |
| | 12 | + | 7, 21 | 2,2 |
| | 4 | - | 10, 3 | 2,1 |
| | 869 | - | 12, homocigota | 2,8 |
| | 865 | - | 6, 15 | 3,3 |
| | 857 | - | 10, 11 | 1,7 |
| | 862 | - | 7, 21 | 1,7 |
| | 852 | - | 11, 12 | 1,3 |
| | 863 | - | 12, homocigota | 1,4 |
| | 851 | - | 12, 18 | 3 |
| | 853 | - | 7, 18 | 3 |
| | 854 | - | 28, homocigota | 2,3 |
| | 855 | - | 7, 18 | 1,2 |
| | 859 | - | 7, 12 | 0,8 |
| | 860 | - | 3, 8 | N.D. |
| | 861 | - | 12, homocigota | 1,7 |
| 868 | - | 8, 18 | 1,2 | |
| 1 | - | 1, 22 | 1,2 | |
| ACT | L.1 | + | 1, 21 | 2,7 |
| | L.2 | + | 7, 18 | >3 |
| | L.4 | + | 12, 24 | >2,8 |
| | 33 | + | 3, 12 | 2,3 |
| | 24 | + | 3, 1 | 2,6 |
| | 23 | + | 7, 11 | 2,5 |
| | 25 | - | 3, 18 | 2,3 |
| | 26 | - | 10, homocigota | 2,2 |
| | 32 | - | 3, 28 | 2,4 |
| | 39 | - | 1, 12 | 1,9 |
| | 40 | - | 3, 18 | 2,6 |
| | L3 | - | 7, 12 | 2,3 |
| L5 | - | 7, 18 | 2,3 | |
| AT | L7 | + | 18, homocigota | 2,8 |
| | L8 | - | 7, homocigota | 2,6 |
| | L11 | - | 18, homocigota | 2,2 |
| | L12 | - | 7, 15 | >2,8 |
| | 10 | - | 3, 8 | 1,5 |
| | 18 | - | 18, 7 | 2,2 |
| | 19 | - | 1, 3 | 2,4 |
| Vacuna viral | 867 | + | 3, 28 | N.D |
| | 34 | + | 18, 24 | 3,1 |
| | 870 | + | 11, 23 | 2,6 |
| | 871 | + | 1, 3 | 3,5 |
| PBS | 872 | - | 1, 18 | N.D |
| | 874 | - | 3, 10 | N.D. |

^a Los bovinos fueron inmunizados con los péptidos sintéticos que se detallan en Materiales y Métodos. ^b + indica los animales protegidos y - indica los animales que presentaron lesiones en por lo menos una de sus patas a los 7 días post desafío. ^c Los números indican los alelos asignados al gen DRB3 (Van Eijk y col., 1992). ^d Datos extraídos de las Tablas 8 a 10. N.D.: no determinado.

En la Figura 8 se compara la frecuencia de alelos del locus DRB3 del CMH clase II presente en los grupos de bovinos vacunados con los péptidos A, AT y ACT y de los animales control (vacunados con virus inactivado o con PBS). La tipificación del gen DRB3 permitió identificar 16 alelos diferentes en la población de bovinos analizados. Cuatro alelos se encontraron sólo 1 vez (DRB3 3701, 6, 22 y 23). El alelo más frecuente fue el 18 (16,3%), seguido por el alelo 7 (15,2%) y por los alelos 3 y 12 (14,1%) (figura 8d). La mayoría de los animales fueron heterocigotas y sólo 8 fueron homocigotas (Tabla 12). Las Figuras 8a y 8b, muestran la distribución de la frecuencia de alelos en los bovinos vacunados con péptido A o ACT que resultaron protegidos frente al desafío viral (4 y 6 animales, respectivamente) y de los que resultaron susceptibles (17 bovinos vacunados con péptido A y 7 vacunados con péptido ACT). Si bien el número de bovinos analizados no permitió establecer una diferencia significativa entre los grupos de bovinos protegidos y susceptibles, se pudo observar la presencia diferencial de los alelos 12 y 18, en los animales susceptibles. En el grupo de bovinos vacunados con péptido A, el alelo 12 no se encontró en los animales protegidos, en tanto que estuvo presente en 6 animales susceptibles. El alelo 18, presentó un patrón semejante en el grupo de animales vacunados con péptido ACT, en cuanto a que se encontró en 3 animales susceptibles y en sólo un animal protegido. Además, ambos alelos fueron de los más frecuentes en el grupo de animales analizado. Los animales 861, 863 y 869, homocigotas para el alelo 12, fueron susceptibles al desafío con virus infeccioso y 2 de 3 presentaron valores bajos de títulos seroneutralizantes (Tabla 12). Esta observación sería consistente con una capacidad limitada del alelo 12 para presentar eficientemente el péptido A. Sin embargo, los animales L7 y L11, ambos homocigotas para el alelo 18, resultaron protegidos y susceptibles, respectivamente frente al desafío viral (Tabla 12 y Figura 8c). Los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones de bovinos presentan con alta frecuencia alelos del locus DRB3 asociados con una respuesta ineficiente a la vacunación con péptidos sintéticos.

Figura 8: Distribución de alelos del gen DRB3 del MHC clase II en bovinos vacunados con péptidos sintéticos y bovinos control



La asignación de alelos del gen DRB3 mostrada en la Tabla 12 se utilizó para estimar la frecuencia de alelos dentro de los grupos de bovinos vacunados con péptido A (A), péptido ACT (B), péptidos A, AT y ACT (C) y la frecuencia de alelos del gen DRB3 en el total de los bovinos analizados, incluyendo animales control vacunados con virus inactivado o PBS (D). ■ Animales protegidos, ■ Animales susceptibles

II. Análisis y caracterización del VFA recuperado de lesiones de bovinos no protegidos frente al desafío viral

II.1 Determinación de la secuencia nucleotídica de la región correspondiente al sitio A de los virus rescatados de las lesiones de bovinos no protegidos

Con el objeto de analizar si la selección de variantes contribuyó a la ruptura de inmunidad en los bovinos que no resultaron protegidos frente al desafío viral y teniendo en cuenta la alta heterogeneidad genética del VFA (Mateu y col., 1989 y Domingo y Holland, 1994) se determinó la secuencia nucleotídica de la región correspondiente al péptido A del virus presente en las lesiones desarrolladas en los bovinos vacunados con los péptidos A, AT o ACT de los diferentes experimentos de vacunación. Se analizaron 29 muestras provenientes de diferentes lesiones de 14 animales. Se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa a partir de ARN total extraído directamente de las lesiones, sin adaptación previa de los virus a células en cultivo. A partir del ADNc obtenido se amplificaron por PCR las secuencias que incluyen las regiones genómicas correspondientes a los sitios antigénicos A y C presentes en los péptidos. La determinación de la secuencia nucleotídica promedio de la región correspondiente al sitio antigénico A mostró la presencia de variantes virales con una única sustitución aminoacídica en 12 muestras de las 29 que se analizaron (correspondientes a 6 animales de 14 analizados) (Tabla 13).

En 2 de 4 lesiones analizadas provenientes del animal 9 (vacunado con péptido AT*) se encontró la sustitución R(141)→G en el triplete RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), involucrado en el reconocimiento del receptor celular (Fox y col., 1989). La sustitución L(144)→P fue encontrada en 8 lesiones correspondientes a los animales 7, 12, 25 y 5 (vacunados con péptido A, AT*, ACT y ACT*, respectivamente). También se encontró la sustitución L(147)→P en 1 lesión de las 2 analizadas en el animal 858 (vacunado con péptido A*) y en las 2 lesiones analizadas del animal 40 (vacunado con péptido ACT).

Se ha demostrado previamente (Mateu, 1995 y Verdaguer y col., 1995), que las posiciones 141, 144 y 147 de la proteína VP1 del VFA tienen un rol crítico en la antigenicidad del sitio A; en estos experimentos todas las variantes virales aisladas presentaron sustituciones aminoacídicas críticas en el sitio antigénico A y acotadas a estas 3 únicas posiciones.

Tabla 13: Secuencia del sitio antigénico A de los virus rescatados de las lesiones de animales no protegidos inoculados con péptidos sintéticos

| Péptido Inoculado ^a | Animal | TSN 50% ^b | Lesión ^c | Secuencia aminoacídica del sitio A (VP1) ^d |
|--------------------------------|--------|----------------------|---------------------|---|
| A | 3 | 1,5 | PDI | sc |
| | | | PTI | sc |
| | 5 | 1,4 | PDD | sc |
| | | | PTD | sc |
| | 7 | 0,9 | PTD | L (144) →P |
| | | | PDD | sc |
| | | | PDI | L (144) →P y sc |
| | | | PTI | L (144) →P |
| | 858 | 2,1 | PTI | L (147) →P |
| | | | PDD | sc |
| AT | 14 | 2,5 | M | sc |
| | 18 | 2,2 | PDI | sc |
| | L9 | 2,8 | PDD | sc |
| | | | PTI | R (141) → G |
| | | | PTD | R (141) → G |
| | L12 | >2,8 | PDI | sc |
| | | | PTD | L (144) →P |
| | 21 | 2,2 | PTI | L (144) →P |
| | | | PDD | sc |
| | ACT | 25 | 2,3 | PDD |
| M | | | | sc |
| 32 | | 2,4 | PTI | sc |
| | | | PTD | sc |
| 40 | | 2,6 | PDI | L (147) →P |
| | | | PDD | L (147) →P |
| L3 | | 2,3 | PDI | sc |
| | | | PDD | sc |
| L5 | 2,3 | PTI | L (144) →P | |
| | | PDD | L (144) →P | |
| PBS | 27 | <0,7 | PDD | sc |
| | 872 | <0,7 | PTI | sc |
| | 874 | <0,7 | PTI | sc |
| | | | PTD | sc |
| | 1.3 | <0,7 | PDD | sc |
| | | | PDI | sc |
| | | | PTI | sc |
| | 1.4 | <0,7 | PDD | sc |
| | | | PDI | sc |
| | | | PTI | sc |
| 30 | <0,7 | L | sc | |
| | | PDI | sc | |

^a Los péptidos sintéticos utilizados se detallan en la Tabla 1 de Materiales y Métodos. ^b Datos extraídos de las Tablas 8 a 10 de Resultados. ^c PDD: Pata delantera derecha, PDI: Pata delantera izquierda, PTD: pata trasera derecha, PTI: pata trasera izquierda, M: morro. ^d De aquellos animales de los que se colectaron muestras de más de una lesión, se muestran las secuencias correspondientes a las lesiones independientes. Se asignó la posición 140a al residuo de arginina (R) que precede a la secuencia RGD. sc: sin cambios

No se encontraron sustituciones aminoacídicas en la región correspondiente al sitio C en ninguna de las lesiones analizadas.

También se determinó la secuencia nucleotídica promedio de la región correspondiente al sitio antigénico A de los virus presentes en las lesiones desarrolladas por los bovinos inoculados con PBS sin adaptación previa de los mismos a células en cultivo. En todas las lesiones analizadas (12 lesiones provenientes de 6 animales control) las secuencias obtenidas no presentaron sustituciones nucleotídicas en la región correspondiente al sitio antigénico A.

Los animales L9, L12 y L5 pertenecientes al mismo experimento de vacunación, se revisaron por primera vez a los 5 días de haber sido desafiado y en ese momento habían aparecido lesiones en todas las zonas examinadas. No se pudo determinar el momento de aparición de las lesiones del animal 858 ya que los animales de ese experimento fueron sólo revisados a los 7 días post desafío. En ese momento, el animal 858 presentaba lesiones en todas las zonas examinadas. Las lesiones del animal 7 aparecieron tempranamente a los 4 días después del desafío y fueron lesiones generalizadas. En los animales 25 y 40 las lesiones aparecieron en forma tardía, 7 días después del desafío en el animal 25 (en las 4 patas) y a los 7 días (en 2 patas) y 10 días (en otra pata) en el animal 40. Una pata de este animal no presentó lesiones.

Se determinó la secuencia nucleotídica promedio completa de la proteína VP1 de las poblaciones virales presentes en 22 de las lesiones analizadas. No se encontraron otras sustituciones aminoacídicas además de las encontradas en la región correspondiente al sitio antigénico A, en las muestras detalladas en la Figura 9.

Figura 9: Determinación de la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína VP1 de los virus presentes en las lesiones de bovinos no protegidos

A

| | A | G | V | R | R | G | D | L | A | H | L | A | A | A | H | A | R | H | L | P |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Desafío | GCT | GGT | GTG | CGT | AGG | GGA | GAT | CTA | GCC | CAT | CTG | GCG | GCG | GCA | CAC | GCT | CGG | CAC | CTG | CCG |
| 3PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L3PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L3PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L5PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L5PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | GGG |
| L9PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | GGG |
| L12PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L12PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14M | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25M | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 858PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 858PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

B

| | 138 | 141 | 144 | 147 | 156 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|--|
| Desafío | ... | T | A | S | A | G | V | R | R | G | D | L | A | H | L | A | A | A | H | A | R | H | L | P | T | S | F | N | F | ... | |
| 3PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L3PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L3PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L5PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L5PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L9PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L12PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L12PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14M | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25M | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32PTD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 32PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40PDI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 858PDD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 858PTI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Se muestra la región de la proteína VP1 correspondiente al sitio antigénico A. **A:** secuencia nucleotídica, **B:** secuencia aminoacídica. Los aminoácidos se nombraron con el código de una letra. En color rojo se muestran las sustituciones nucleotídicas y aminoacídicas encontradas.

II.2 Amplificación en cultivo de células de las variantes virales recuperadas de bovinos no protegidos

Las poblaciones de las variantes virales presentes en bovinos no protegidos frente al desafío viral se amplificaron a partir de las lesiones por pasajes en células en cultivo. Con el propósito de evaluar si el comportamiento de las variantes virales era diferente en distintos cultivos celulares, las mismas se amplificaron en dos sistemas celulares distintos: la línea celular BHK-21 clón 13 y cultivos primarios de células de RFB.

A partir de los sobrenadantes de las células infectadas, se extrajo ARN, se realizó una reacción de RT-PCR y se determinó la secuencia nucleotídica de la región correspondiente al sitio antigénico A.

Se amplificaron las siguientes variantes virales: **40 PDD** que presenta la sustitución L(147)→P, **L9 PTD** y **L9 PTI** que presentan la sustitución R(141)→G, y las variantes **L12 PTD**, **25 PDD** y **L5 PTI** que presentaron la misma sustitución (L 144) →P).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Amplificación de las variantes virales en cultivo de células

| Variantes virales ^a | Posición mutada ^b | CELULAS ^c | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | | BHK-21 | | RFB | | |
| | | 1 pasaje | 2 pasajes | 1 pasaje | 2 pasajes | 3 pasajes |
| 40 PDD | L (147) →P | ND | P + L | P | P | P |
| L9 PTI y L9 PTD | R (141) →G | ND | G | G | G | G |
| L12 PTD | L (144) →P | ND | L | P | P | P |
| 25 PDD | L (144) →P | ND | L | P | P | p + L |
| L5 PTI | L (144) →P | ND | L | P | P | P + I |

Las poblaciones virales variantes recuperadas de las lesiones de bovinos no protegidos frente al desafío viral se amplificaron mediante pasajes en cultivo de células. ^a Las variantes virales se nombran con el número de animal y la pata en la que se aislaron, PDD: Pata delantera derecha, PTD: pata trasera derecha, PTI: pata trasera izquierda. ^b La posición mutada dentro del sitio antigénico A se indica con el aminoácido presente en el virus del desafío, la posición del mismo y el aminoácido encontrado en la variante viral. Se utiliza el código de una letra para nombrar los aminoácidos. ^c Se utilizaron dos tipos celulares: la línea celular BHK-21 y el cultivo primario de riñón fetal bovino (RFB). Se indica el aminoácido encontrado en la posición mutada luego de 1, 2 y 3 pasajes en cada tipo celular. P + I: población viral heterogénea con preponderancia del aminoácido prolina en la posición indicada. p + L: población viral heterogénea con preponderancia del aminoácido leucina en la posición indicada. ND: no determinado

Cuando los virus variantes L12 PTD, 25 PDD y L5 PTI se amplificaron mediante 2 pasajes consecutivos en células BHK-21 se recuperaron poblaciones virales cuya secuencia promedio en la región codificante para el sitio A correspondía a la del virus utilizado en el desafío viral (leucina en la posición 144). De la amplificación de la variante 40 PDD por 2 pasajes en BHK-21 se recuperó una población viral heterogénea con mezcla de virus variante (prolina en la posición 147) y virus de desafío (leucina en la misma posición). Cuando se amplificaron las variantes L9 PTD y L9 PTI en iguales condiciones la secuencia promedio de las poblaciones virales recuperadas fue la correspondiente a la variante viral (glicina en la posición 141).

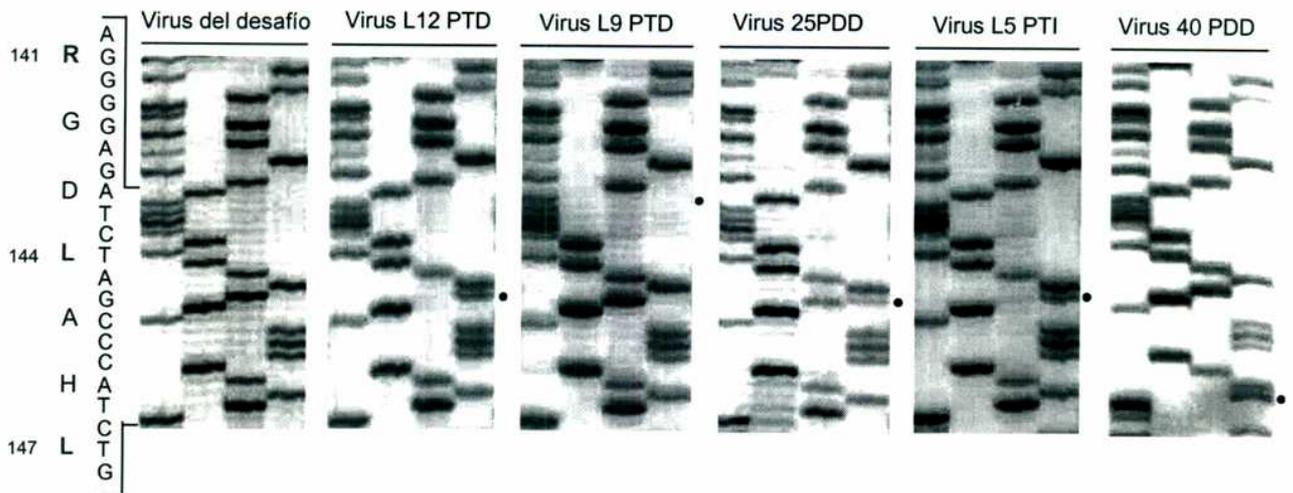
Todas las poblaciones virales provenientes de 2 pasajes en células de RFB conservaron la secuencia correspondiente a las variantes virales. Sin embargo, luego de un tercer pasaje en células RFB las poblaciones de los virus 25 PDD y L5 PTI mostraron heterogeneidad en la secuencia nucleotídica correspondiente a las posiciones mutadas. La población proveniente del virus rescatado de la lesión L5 PTI resultó enriquecida en la secuencia variante en tanto que la proveniente de la lesión 25 PDD mostró un enriquecimiento en la secuencia del virus del desafío. Las poblaciones virales 40 PDD, L12 PTD, L9PTI y L9PTD recuperadas conservaron la secuencia mutante. La estabilidad de las mutaciones fue mayor en las células RFB que en la línea celular BHK-21. Estos resultados están de acuerdo con la producción y selección de variantes virales observadas al someter un virus clonado a un número bajo de pasajes en distintos sistemas celulares (Kaplan, 1986).

El virus utilizado en el desafío se amplificó mediante pasajes en células BHK y cultivos primarios de RFB y en todos los casos las poblaciones virales recuperadas mantuvieron la secuencia original en la región correspondiente al sitio antigénico A.

El criterio utilizado para caracterizar una población viral como homogénea o heterogénea fue la presencia de una única banda o de bandas dobles en la secuencia nucleotídica promedio, respectivamente.

En la Figura 10 se muestran los geles de secuencia de la región correspondiente al sitio antigénico A de las poblaciones virales variantes amplificadas mediante tres pasajes en células RFB. Se observa la presencia de la mutación característica de cada población viral así como también la presencia de bandas dobles en las poblaciones virales heterogéneas.

Figura 10: Secuencia nucleotídica de la región correspondiente al sitio antigénico A de las poblaciones virales variantes provenientes de tres pasajes en células RFB



A partir de los sobrenadantes de infección de las poblaciones virales variantes provenientes de tres pasajes en células RFB, se extrajo ARN viral, se realizó una reacción de RT-PCR y se determinó la secuencia nucleotídica del sitio antigénico A de las distintas variantes virales (punto 15 de Materiales Métodos). La figura muestra los gels de secuencia obtenidos. Con • se indica la base mutada en cada secuencia analizada respecto de la secuencia del virus del desafío. • Indica la presencia de una banda doble en el gel de secuencia en la posición señalada. Se indica la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región del sitio antigénico A donde se encuentran las mutaciones. Los aminoácidos mutados en los virus variantes se indican en rojo.

II.3 Caracterización fenotípica de las variantes virales recuperadas de bovinos no protegidos

II.3.a Tamaño de placa y título viral

Las preparaciones virales que se utilizaron para la caracterización fenotípica de las poblaciones virales variantes fueron los terceros pasajes en RFB y en los casos en que fue necesario se evaluaron también los segundos pasajes. El virus utilizado en el desafío viral también se sometió a 3 pasajes en células RFB y se corroboró la conservación de la secuencia original.

El virus del desafío formó placas de lisis de 5-6 mm de diámetro bajo agar al 1% e incubación a 37°C en estufa gaseada durante 48 horas. La preparación de virus del desafío presentó un título viral de 8×10^6 ufp/ml en células BHK-21.

Las placas de lisis obtenidas con la preparación del virus L9 PTD fueron más pequeñas que las del virus utilizado en el desafío (2-3 mm de diámetro), menos nítidas y con bordes

más difusos en similares condiciones de incubación. Por esta razón, se incubaron durante 48 horas pero bajo agar a una concentración del 0,7%. En estas condiciones se obtuvieron placas de bordes más definidos y más fáciles de contar de un diámetro de 2-4 mm. El título de esta preparación viral en células BHK-21 fue de 4×10^6 ufp/ml.

El virus variante 40 PDD produjo placas de lisis un poco más pequeñas que las del virus utilizado en el desafío (3-4 mm de diámetro), pero más difusas. El título de esta preparación viral en células BHK-21 fue de 7×10^6 ufp/ml.

Estos resultados indican que la presencia de las mutaciones en el sitio A tienen un efecto en las características fenotípicas de las poblaciones virales mutantes.

La preparación de virus L12 PTD formó placas de similares características que las del virus del desafío, pero el título viral de ésta preparación fue muy bajo 6×10^2 ufp/ml. No se obtuvieron placas de lisis cuando se utilizó la preparación de virus L12 PTD proveniente de un segundo pasaje en RFB.

La preparación de virus 25 PDD formó placas de lisis similares a las del virus del desafío cuando se utilizó el tercer pasaje en RFB, y el título de la preparación en células BHK-21 fue de 2×10^6 ufp/ml. Sin embargo, no se obtuvieron placas de lisis cuando se realizó el ensayo en iguales condiciones pero con la población resultante del segundo pasaje en RFB.

La preparación de virus variante L5 PTI formó placas de lisis semejantes a las del virus del desafío y presentó un título viral de 8×10^5 ufp/ml. No se evaluó la formación de placas de lisis con el segundo pasaje en RFB. En la Tabla 15 se resumen las características fenotípicas de las poblaciones virales en estudio.

Tabla 15: Características fenotípicas de las poblaciones virales variantes

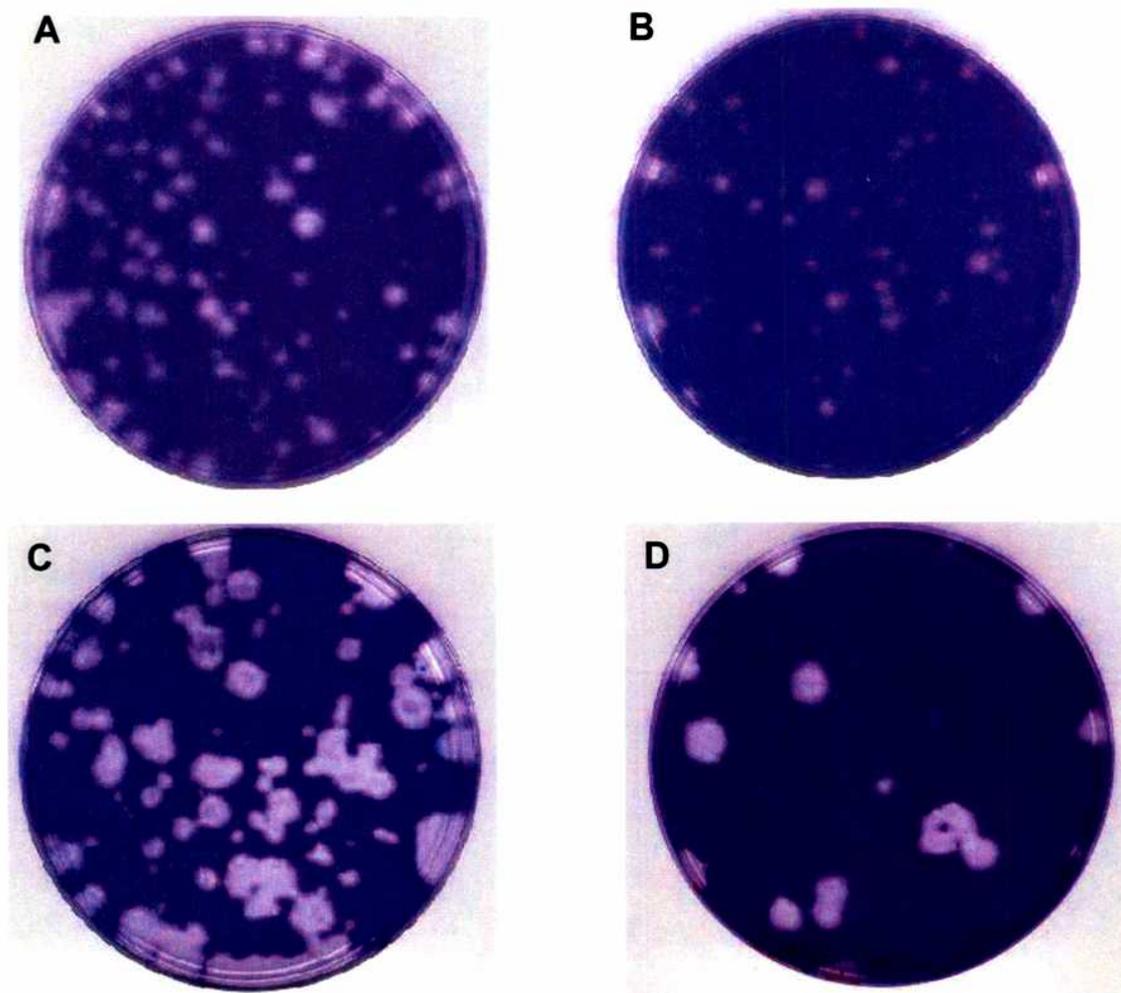
| Variante viral | Número de pasaje en RFB | Título viral ^a | Concentración de agar ^b | Tiempo de incubación ^c | Diámetro de las placas (mm) ^d |
|----------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| 40 PDD | 3 | 7 x 10 ⁶ | 1% | 48 hs | 3-4 |
| L9 PTD | 3 | 4 x 10 ⁶ | 0,7% | 48 hs | 2-4 |
| L12 PTD | 3 | 6 x 10 ² | 1% | 48 hs | 5-6 |
| L12 PTD | 2 | N. D. | 1% | 48 hs | N. D. |
| 25 PDD | 3 | 2 x 10 ⁶ | 1% | 48 hs | 5-6 |
| 25 PDD | 2 | N. D. | 1% | 48 hs | N. D. |
| L5 PTI | 3 | 8 x 10 ⁵ | 1% | 48 hs | 5-6 |
| Desafío | 3 | 8 x 10 ⁶ | 1% | 48 hs | 5-6 |

Se inocularon monocapas de células BHK-21 con diluciones seradas al 1/10 de las poblaciones virales variantes provenientes de 2 o 3 pasajes en células RFB y se cubrieron con medio semisólido conteniendo las concentraciones de agar indicadas en la tabla. A los diferentes tiempos de incubación, las monocapas se fijaron con formol y se tiñeron con cristal violeta. ^a Título viral medido en ufp/ml. ^b concentraciones de agar del medio semisólido utilizado en los ensayos de titulación por placas de lisis. ^c Tiempo de incubación de las monocapas celulares a 37°C para el desarrollo de la placas de lisis. ^d Diámetro en mm de las placas de lisis obtenidas en las diferentes condiciones de incubación. N.D: no detectable.

En general, en las poblaciones L12 PTD, 25 PDD y L5PTI (L 144) →P), la detección de placas de lisis (cuyo fenotipo fue similar al de las obtenidas con el virus del desafío) coincidió con la presencia de poblaciones heterogéneas (mutante y parental) en los geles de secuencia. Estas observaciones sugieren que las placas de lisis detectadas en estas poblaciones virales corresponderían al virus parental.

A pesar de que las preparaciones virales L12 PTD, 25 PDD, provenientes de 2 pasajes en células RFB no presentaron un título viral detectable en las condiciones experimentales utilizadas, las masas virales de estas poblaciones en ensayos de ELISA (Punto 16 de Materiales y Métodos) fueron similares a las del virus del desafío.

Figura 11: Placas de lisis características de las poblaciones virales variantes



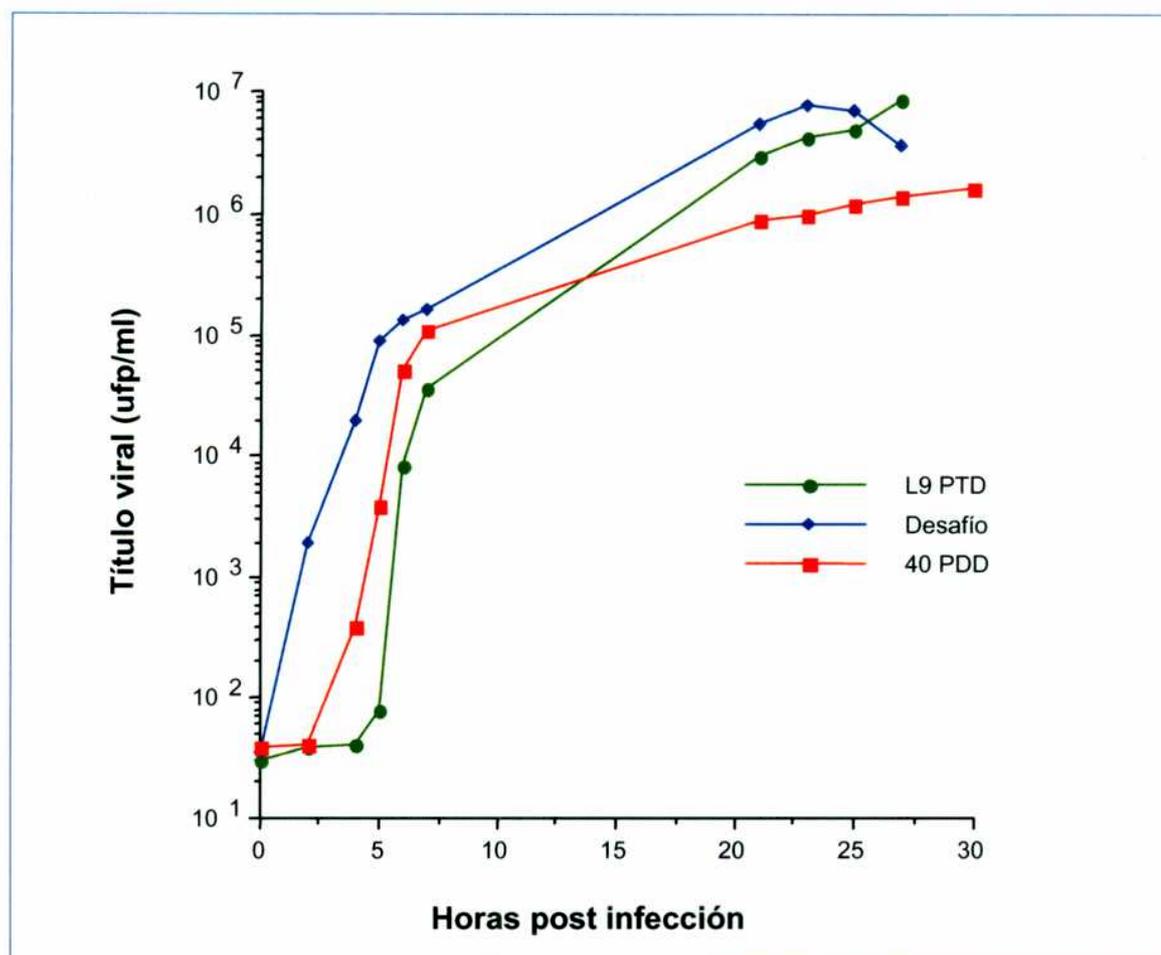
Se inocularon monocapas de células BHK-21 con diluciones adecuadas de las preparaciones virales variantes provenientes de 3 pasajes en células RFB, se cubrieron con medio semisólido conteniendo agar a una concentración del 1% ó ,7% y a las 48 horas post infección las monocapas se fijaron con formol y se tiñeron con cristal violeta. **A:** 40PDD, **B:** L9 PTD, **C:** virus del desafío, **D:** virus L12 PTD.

II.3.b Curvas de crecimiento

Para evaluar la capacidad replicativa de los virus variantes L9 PTD (R (141)→G) y 40 PDD (L (147)→P) respecto al virus del desafío, se realizaron curvas de crecimiento de un sólo ciclo de replicación. Para ello, se infectaron células BHK-21 a una moi de 10 ufp/célula con las preparaciones virales provenientes de 3 pasajes en células RFB. A diferentes tiempos post infección, se colectaron muestras de los sobrenadantes de infección y se titularon en células BHK-21.

La Figura 12 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para el virus del desafío y las variantes L9 PTD y 40 PDD. El comportamiento de los virus variantes fue similar al del virus desafío excepto en los tiempos tempranos de la infección. A las 2 horas post infección, el virus del desafío mostró un título viral 100 veces mayor que el detectado en el tiempo 0 de infección (luego de la hora de adsorción y el lavado de las monocapas con pH ácido), en tanto que los virus variantes L9 PTD y 40 PDD mantuvieron los mismos títulos virales que en el tiempo 0. El aumento del título de virus 40 PDD fue detectado a las 4 horas y el del virus L9 PTD más tardíamente, a las 6 horas post infección. Sin embargo, los títulos finales obtenidos para los 3 virus fueron similares.

Figura 12: Curvas de crecimiento de las variantes virales L9 PTD y 40 PDD y del virus utilizado en el desafío de bovinos



Se infectaron monocapas de células BHK-21 con el virus utilizado en el desafío y con los virus variantes 9 PTD y 40 PDD provenientes de 3 pasajes en células RFB a una moi de 10 ufp por célula. A los tiempos post infección indicados en la figura, se tomaron alícuotas del sobrenadante de infección y se titularon en células BHK-21. ♦ Virus del desafío, ● Virus variante L9 PTD, ■ Virus variante 40 PDD. La figura 12 es representativa de tres experimentos independientes.

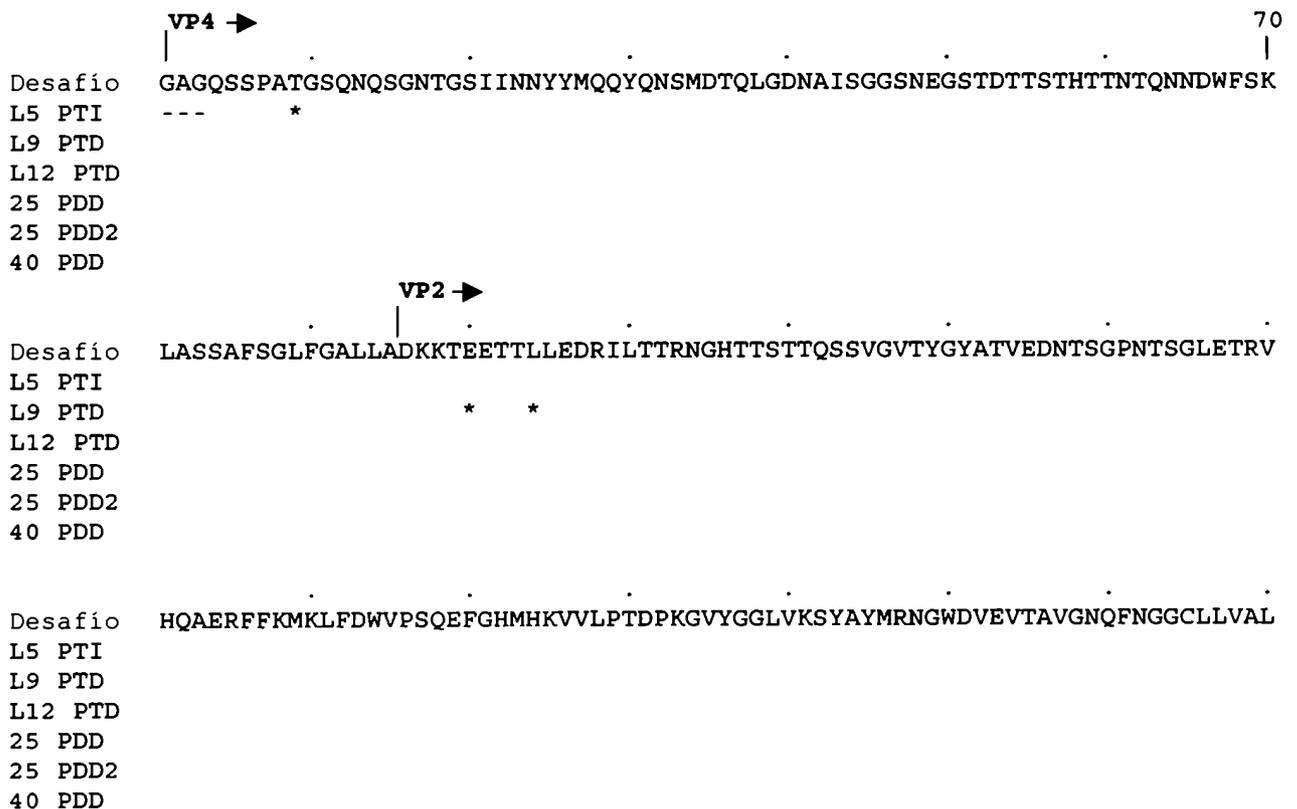
II.4 Caracterización genómica de las variantes virales

Muchas de los virus variantes que presentaron sustituciones críticas en los aminoácidos que flanquean el triplete RGD, presentaron también sustituciones en otras posiciones que, en muchos casos, se postularon como compensatorias. Con el propósito de determinar la presencia de mutaciones en otras regiones diferentes del sitio antigénico A que pudieran modular el comportamiento de las variantes virales, se determinó la secuencia nucleotídica completa de la región del genoma viral que codifica para las proteínas

estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) de las variantes virales en estudio. Para ello, a partir de los sobrenadantes de infección provenientes de 3 pasajes en RFB de las poblaciones L9 PTD, 40 PDD, L12 PTD, L5 PTI, 25 PDD y del virus de desafío y de 2 pasajes en RFB de la variante viral 25 PDD, se extrajo ARN viral, se amplificaron por RT-PCR fragmentos solapados de ADN de modo tal que cubrieran toda la región que codifica para las cuatro proteínas estructurales del VFA (poliproteína P1) y se determinó la secuencia nucleotídica promedio de la poliproteína P1 de cada variante viral (Figura 13).

La comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes con la del virus del desafío mostró que las únicas sustituciones aminoacídicas en toda la región analizada correspondían a las presentes en el sitio antigénico A (Tabla 13 de Resultados), mientras que otros sitios antigénicos relevantes (sitios A y C) no presentaron variaciones en su secuencia.

Figura 13: Secuencia aminoacídica de la proteínas de la cápside de las variantes virales L5 PTI, L9 PTD, L12 PTD, 25 PDD y 40 PDD.



Desafio VPEAGDISDREKYQLTLYPHQFINPRTNMTAHITVPYVGVNRYDQYKQHRPWTLVVMVVAPLTVNTSGAQ
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

VP3 →

Desafio QIKVYANIAPTNVHVAGELPSKEGIFPVACTDGYGNMVTDPKTADPAYGKVYNPPRTALPGRFTNYLDV
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

Desafio AEACPTLLMFENVVPYVSTRTDGQRLLAKFDVSLAAKHMSNTYLAGLAQYYTQYAGTINLHFMFTGPTDAK
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

Desafio ARYMVAYVPPGMEAPDNPEEAAHCIHAEWDTGLNSKF TFSIPYISAADYAYTASSEAETTSVQGWVCVYQ
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

*

VP1 →

Desafio ITHGKADADALVVSASAGKDFELRLPVDARPQTTATGESADPVTTTVENYGGGETQIQRRHHTDVAFVLDR
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

Desafio FVKVQVSGNQHTLDVMQAHKNSIVGALLRAATYYFSDLEIAVTHTGKLTWVPNGAPVSALDNTTNPTAYH
L5 PTI
L9 PTD
L12 PTD
25 PDD
25 PDD2
40 PDD

| | | | | |
|---------|--|------|----------------|-----|
| | | 140a | 144 | 147 |
| | | | | |
| Desafío | KGPLTRLALPYTAPHRVLATTTGTAYSAGVRRGDLAHLAAAHARHLPTSFNFGAVKAETITELLVRMK | | | |
| L5 PTI | | | P ² | |
| L9 PTD | | G | | |
| L12 PTD | | | P | |
| 25 PDD | | | P ¹ | |
| 25 PDD2 | | | P | |
| 40 PDD | | | | p |

| | |
|---------|----------------------------------|
| Desafío | RAELYCPRPVLPVQPSGDRYKQPLIA AKQLL |
| L5 PTI | |
| L9 PTD | |
| L12 PTD | |
| 25 PDD | |
| 25 PDD2 | |
| 40 PDD | |

A partir de las preparaciones virales provenientes de 2 o 3 pasajes en células RFB, se extrajo ARN viral, se amplificó la región correspondiente a la poliproteína P1 por RT-PCR, se determinó la secuencia nucleotídica promedio y se dedujo la secuencia aminoacídica. Se utilizó el código de una letra para indicar los aminoácidos. Para las variantes virales se indican los aminoácidos que difieren del virus utilizado en el desafío viral. Los segmentos no secuenciados se indican con guiones; los asteriscos representan aminoácidos no definidos. El sitio antigénico A se indican en color rojo, los aminoácidos que conforman el sitio discontinuo D se indican en azul y los que conforman el sitio antigénico C se muestran en color verde. La numeración es la utilizada por Mateu y colaboradores, 1994. ¹ en la posición indicada se observó mezcla de P/L con predominio de L. ² en la posición indicada se observó mezcla P/L con predominio de P.

II.5 Caracterización antigénica de las variante virales utilizando sueros policlonales provenientes de bovinos vacunados con péptidos sintéticos

II.5.a Neutralización de la infectividad viral de las variantes L9 PTD y 40 PDD

La ruptura de inmunidad observada en el transcurso de los experimentos de vacunación, no se debió únicamente a la aparición de variantes virales, ya que de las lesiones de muchos bovinos que no resultaron protegidos frente al desafío viral se aislaron poblaciones virales con la secuencia del virus del desafío. Sin embargo, es posible plantear distintas hipótesis para explicar la falta de protección en los bovinos de los que se aislaron mutantes de escape:

a) La selección de variantes virales con sustituciones en posiciones críticas dentro del sitio antigénico A son responsables de la falta de protección en los animales en las que se seleccionaron. Si esta hipótesis fuera correcta, sueros provenientes de diferentes

animales vacunados con péptidos sintéticos no neutralizarían la variante viral o lo harían con baja eficiencia, independientemente de que estos sueros provinieran de animales protegidos o susceptibles frente al desafío.

b) El éxito o fracaso para detener la infección depende de la composición cuantitativa y cualitativa del suero de cada animal. De esta forma, en bovinos inoculados con el mismo péptido sintético se generarán subpoblaciones de anticuerpos contra distintos epitopes o con distintos títulos contra el mismo epitope dependiendo de qué epitopes sean presentados en cada bovino según las restricciones genéticas impuestas por la composición de alelos del CMH. Si esta hipótesis fuera correcta, la composición de anticuerpos del suero de algunos bovinos permitirá la selección de variantes virales que serán neutralizadas eficientemente por sueros provenientes de otros bovinos inmunizados con péptidos cuyo suero tiene una composición cualitativa y cuantitativa distinta a la del animal en que se generó la variante.

Entonces, si el suero de un bovino presenta altos títulos seroneutralizantes frente al virus del desafío y frente a diferentes variantes virales es muy probable que el bovino resulte protegido frente al desafío, excepto que se seleccione una variante viral con una mutación en un sitio crítico.

Con el fin de evaluar las hipótesis antes mencionadas, se realizaron ensayos de neutralización de la infectividad viral en los que se utilizaron los virus 40 PDD (L(147)→P) y L9 PTD (R(141)→G) y el virus del desafío, que se incluyó como control del experimento. Cada una de estas poblaciones virales se enfrentó con diferentes sueros policlonales provenientes de bovinos vacunados con péptidos sintéticos: el suero del animal en el cual se generaron (sueros L9 y 40), el suero de un animal vacunado con péptido A y protegido frente al desafío viral (suero 12), el suero de un animal vacunado con péptido ACT y protegido frente al desafío viral (suero L1), con los sueros de los animales en los que se generaron otras variantes (sueros L12, L5 y 25), el suero de un animal placebo (suero 1.3) y el suero de un animal vacunado con virus inactivado (suero 1.1). Todos los sueros utilizados en estos ensayos provinieron de sangrías post *booster* y presentaron títulos seroneutralizantes similares frente al virus del desafío, excepto los provenientes de animales control (sueros 1.3 y 1.1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16. Cuando se compararon los títulos neutralizantes de los sueros provenientes de los animales L9 y 40 frente al virus homólogo (variantes L9 PTD y 40 PDD, respectivamente) y frente al virus utilizado en el desafío viral, se observó que el suero del animal 40 era

incapaz de neutralizar al virus 40 PDD generado en este animal (TSN < 0,7) pero presentaba títulos neutralizantes altos frente al virus del desafío (TSN = 2,5). El suero del animal L9 presentó un comportamiento intermedio ya que fue capaz de neutralizar al virus L9 PTD (TSN = 1,4) pero no tan eficientemente como lo hizo con el virus del desafío (TSN = 2,5). Los sueros L1 y 12 provenientes de animales vacunados con péptidos sintéticos y protegidos frente al desafío fueron capaces de neutralizar al virus L9 PTD con títulos similares a aquellos obtenidos con estos mismos sueros y el virus de desafío. Sin embargo, estos sueros presentaron títulos muy bajos cuando se los enfrentó al virus 40 PDD, especialmente el suero proveniente del animal 12. El suero del animal 40 fue capaz de neutralizar eficientemente al virus variante L9 PTD. Sin embargo, la variante viral 40 PDD fue neutralizada con títulos bajos por el suero del animal L9. Los sueros provenientes de los animales L5, L12 y 25 donde se generaron las variantes con la sustitución L(144)→P (Tabla 13), neutralizaron al virus L9 PTD (TSN = 1,3, 2 y 1,6, respectivamente) aunque los títulos obtenidos fueron menores que con el virus del desafío (TSN = 2,3, >2,8 y 2,3, respectivamente). El suero del animal 25 no fue capaz de neutralizar al virus 40 PDD (TSN < 0,7) y los sueros de los animales L12 y L5 mostraron bajos títulos seroneutralizantes (TSN = 1,3 y 1,1, respectivamente).

El suero proveniente del animal vacunado con virus inactivado (suero 1.1) fue capaz de neutralizar muy eficientemente tanto a las variantes virales L9 PTD y 40 PDD como al virus del desafío, lo cual confirma resultados presentados por Feigelstock y colaboradores, (1992) y Mateu y colaboradores, (1994), que mostraron que otros sitios distintos del sitio antigénico A presentes en la partícula viral entera contribuyen a la neutralización del VFA.

Del análisis de los resultados presentados en la Tabla 16 surge que la mutación L(147)→P es crítica en la antigenicidad del VFA, ya que tanto los sueros de animales que resultaron protegidos frente al desafío como los sueros de animales en donde se generaron otras variantes virales, no fueron capaces de neutralizar a la variante 40 PDD o lo hicieron con títulos seroneutralizantes muy bajos, a pesar de que estos sueros neutralizan eficientemente al virus del desafío. Estos resultados sugieren que la falta de protección frente al desafío observada en el animal 40 posiblemente se debió a la selección de una variante viral con una sustitución crítica y no a una respuesta inmune deficiente.

La ruptura de inmunidad observada en el animal L9, en cambio, es posible que se haya generado como consecuencia de la composición de su suero, ya que tanto los sueros de

animales que resultaron protegidos frente al desafío como los sueros de animales en los que se generaron otras variantes virales neutralizaron a la variante L9 PTD (R(141)→G) con títulos neutralizantes altos o intermedios. Si bien era de esperar que la sustitución R(141)→G, que afecta al triplete RGD involucrado en el reconocimiento del receptor celular, fuera muy importante en la antigenicidad del VFA, los resultados sugieren que la región RGD es importante desde el punto de vista funcional pero no antigénico.

Estos resultados revelan la gran heterogeneidad en la composición de anticuerpos neutralizantes presentes en los sueros evaluados, ya que a pesar de que todos ellos fueron generados contra inmunógenos semejantes y químicamente definidos, se comportan de manera diferente frente a las variantes virales analizadas.

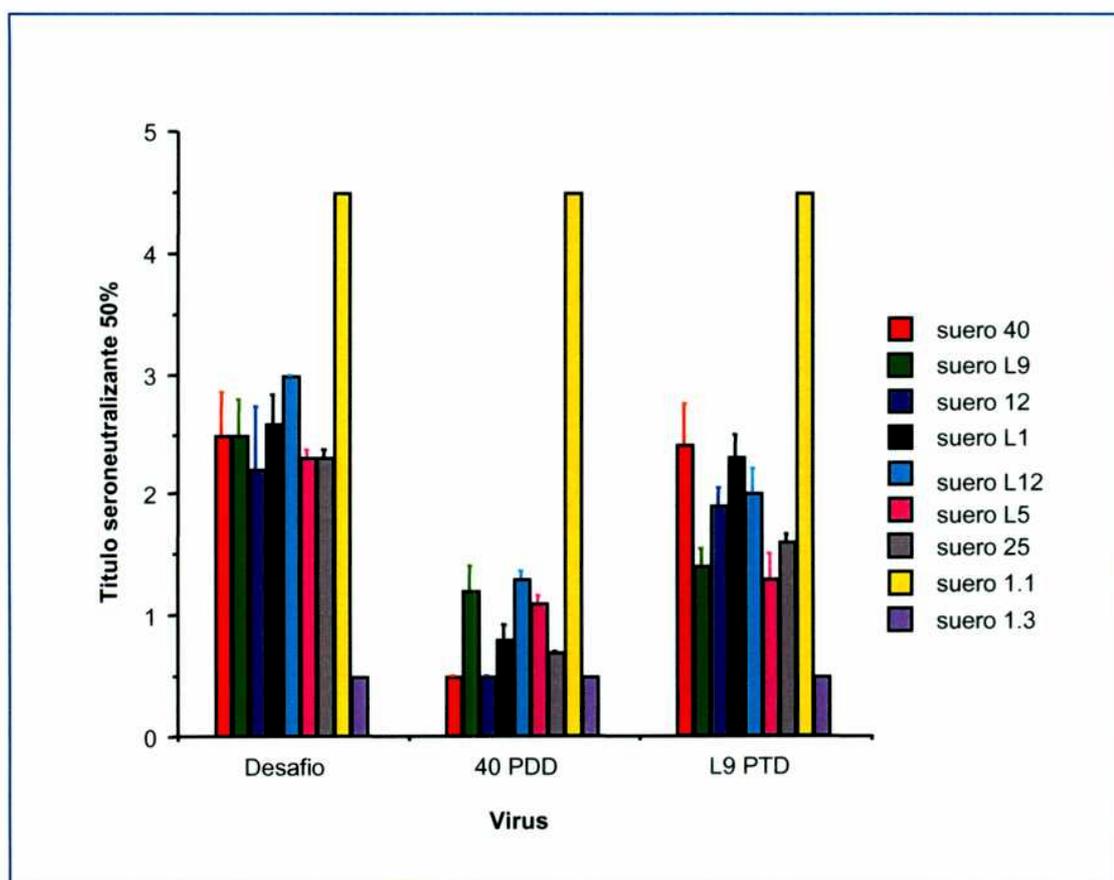
Tabla 16: Comportamiento de las variantes virales L9 PTD y 40 PDD y del virus del desafío en ensayos de neutralización de la infectividad viral con sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos.

| Antisuero animal ^a | Títulos seroneutralizantes frente a: ^b | | |
|-------------------------------|---|---------------------|-------------------|
| | 40 PDD (L (147) →P) | L9 PTD (R (141) →G) | Virus del desafío |
| 40 (ACT) | < 0,7 | 2,4 +/- 0,36 | 2,5 +/- 0,36 |
| L9 (AT) | 1,2 +/- 0,21 | 1,4 +/- 0,15 | 2,5 +/- 0,3 |
| 12 (protegido A) | < 0,7 | 1,9 +/- 0,15 | 2,2 +/- 0,54 |
| L1 (protegido ACT) | 0,8 +/- 0,13 | 2,3 +/- 0,2 | 2,6 +/- 0,23 |
| L12 (AT) | 1,3 +/- 0,07 | 2 +/- 0,2 | >2,8 |
| L5 (ACT) | 1,1 +/- 0,07 | 1,3 +/- 0,2 | 2,3 +/- 0,07 |
| 25 (ACT) | <0,7 | 1,6 +/- 0,07 | 2,3 +/- 0,07 |
| 1.1 (VFA) | >4 | >4 | >4 |
| 1.3 (PBS) | <0,7 | <0,7 | <0,7 |

Se utilizaron poblaciones virales provenientes de 3 pasajes en células RFB. ^a Los sueros utilizados en los ensayos de seroneutralización provinieron de sangrías post *booster*. ^b Los títulos seroneutralizantes se calcularon como el Log. de la mayor dilución de suero capaz de reducir el número de placas al 50% y son el promedio de por lo menos 3 determinaciones independientes. Los ensayos se desarrollaron en células BHK-21.

Los resultados obtenidos en los experimentos de neutralización de las variantes virales con sueros policlonales provenientes de los bovinos vacunados con péptidos sintéticos se grafican en la Figura 14.

Figura 14: Representación gráfica de los resultados de neutralización de las variantes virales L9 PTD y 40 PDD con sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos



Se grafican los títulos seroneutralizantes 50% de los sueros detallados en la Tabla 16 al enfrentarlos a las variantes virales L9 PTD y 40 PDD y al virus utilizado en el desafío viral. La ausencia de barra de error indica que los valores fueron inferiores ■ o superiores ■ a los valores graficados.

II.5.b Pasajes seriados de las variantes virales en presencia de sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos

La variación antigénica en los virus surge como consecuencia de sustituciones aminoacídicas en los dominios de las proteínas que interaccionan con los componentes del sistema inmune. Se ha propuesto que la selección ejercida por los anticuerpos del hospedador tiene un papel muy importante en la evolución del VFA, ya que se seleccionaron variantes antigénicas del VFA en bovinos persistentemente infectados (Gebauer y col., 1988) y luego de pasajes en cultivo de tejidos en presencia de suero policlonal específico (Carrillo y col., 1989, Rieder Rojas y col., 1992 y Schiappacassi y col., 1995). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la selección de variantes antigénicas puede ocurrir también en ausencia de presión inmune durante la replicación viral (Bolwell y col., 1989, Diez y col., 1989, Borrego y col., 1993).

Con el objetivo de reproducir *in vitro* el proceso de selección de variantes virales en presencia de presión inmune y evaluar su importancia en la selección de las mismas se realizaron experimentos de pasajes seriados en cultivo de células:

1. Para evaluar si es posible seleccionar *in vitro* las variantes virales seleccionadas en los bovinos vacunados, se realizaron 10 pasajes seriados del virus del desafío (proveniente de 3 pasajes en células RFB) en cultivos primarios de RFB en presencia de concentraciones subneutralizantes de los sueros de los animales no protegidos de los que se aislaron las variantes virales. Como control, se efectuaron 10 pasajes seriados del virus del desafío en presencia de suero no inmune. A partir de los virus recuperados luego de los pasajes seriados se extrajo ARN total y se determinó la secuencia nucleotídica promedio correspondiente al sitio antigénico A. En todos los casos las secuencias correspondieron a las del virus del desafío.

2. El objetivo del siguiente experimento fue analizar las posibles implicancias de la presión inmune en la selección de las variantes virales. Para ello, se realizaron 10 pasajes seriados de cada variante viral en presencia o ausencia de concentraciones subneutralizantes del suero del animal del que se aislaron y se determinó la fijación de la mutación característica, en la población viral recuperada. Estos experimentos se desarrollaron en la línea celular BHK-21 y en cultivos primarios de RFB debido al comportamiento diferencial observado anteriormente en los dos tipos celulares (Tabla 14). Los experimentos de pasajes seriados se iniciaron con las poblaciones virales provenientes de 3 pasajes en RFB para las variantes que presentaron una secuencia

nucleotídica promedio homogénea correspondiente a la variante viral (variantes L9 PTD y 40 PDD) y con la población proveniente de 2 pasajes en RFB para la variante 25 PDD. Las Tablas 17 y 18 muestran las secuencias nucleotídicas promedio correspondientes al sitio antigénico A y las secuencias aminoacídicas deducidas de las poblaciones virales recuperadas luego de los pasajes en células RFB y BHK-21, respectivamente.

Todos los virus recuperados luego de los pasajes en células BHK-21 y RFB en ausencia de presión inmune presentaron la secuencia del virus del desafío en la región correspondiente al sitio antigénico A, lo cual demuestra la ventaja replicativa de este virus respecto de la de los virus variantes en ambos tipos celulares. No se determinó la secuencia de las poblaciones virales provenientes de pasajes intermedios por lo que no es posible determinar a partir de qué pasaje comienza a detectarse la población viral con la secuencia del virus del desafío. Sin embargo, es posible que este evento ocurra tempranamente debido a que en los experimentos de amplificación de las variante virales en células en cultivo (Punto II.2 de Resultados) se recuperaron poblaciones virales con la secuencia del virus del desafío (variantes L12 PTD, 25 PDD y L5 PTI, L(144)→P) o poblaciones virales heterogéneas con mezcla de virus variante y virus de desafío (variante 40 PDD, L(147)→P) luego de 2 pasajes en células BHK y poblaciones mixtas luego de 3 pasajes en células RFB (variantes 25 PDD y L5 PTI, L(144)→P).

Cuando se analizaron las poblaciones virales recuperadas luego de 10 pasajes en presencia de presión inmune, se determinó que los virus 40 PDD y L9 PTD conservaron sus mutaciones características en presencia de sus sueros correspondientes, tanto en células BHK-21 como en cultivos primarios de RFB. Estos resultados sugieren la importancia de la presión inmune en la selección de estas variantes en los bovinos L9 y 40 y la aparición de las mismas en las lesiones colectadas en dichos animales.

La población viral recuperada a partir del virus 25 PDD luego de 10 pasajes en ausencia de presión inmune en células RFB presentó una sustitución aminoacídica nueva (L(144)→S) en la misma posición del sitio A que la de la variante original, lo que sugiere que la posición 144 sería muy permisiva a los cambios aminoacídicos. En células BHK, se recuperó una población viral con la secuencia del virus del desafío.

Cuando las variantes virales L12 PDD y L5 PTI se pasaron en células BHK-21 en presencia del suero de los animales correspondientes, la secuencia del sitio A de las poblaciones virales recuperadas fue la correspondiente a la del virus del desafío (datos no mostrados).

También se realizaron pasajes de las variantes L12 PTD y 25 PDD en células BHK-21 en presencia de los sueros 25 y L12, respectivamente. Nuevamente, las poblaciones recuperadas presentaban la secuencia del virus del desafío en la región correspondiente al sitio antigénico A (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que otras presiones diferentes de la inmune pueden haber intervenido en la selección de las variantes L(144)→P, o bien que las condiciones de presión inmune utilizadas en estos experimentos no fueron las adecuadas para estas variantes, especialmente teniendo en cuenta la desventaja replicativa que tienen respecto al virus del desafío.

Tabla 17: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región correspondiente al sitio antigénico A de las poblaciones virales recuperadas luego de 10 pasajes seriados en células RFB en presencia o ausencia de presión inmune

A

| Virus ^a | Presencia de suero homólogo ^b | Número de pasaje de ^c | Secuencia nucleotídica del sitio antigénico A | | | | | | | | | | |
|--------------------|--|----------------------------------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 140 | 140a | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 |
| Desafío | no | 3* 10 | GTG | CGT | AGG | GGA | GAT | CTA | GCC | CAT | CTG | GCG | GCG |
| 9 PTD | no | 3* | G | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | T/C G | | | | | | | | | | |
| 40 PDD | no | 3* | | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | C | | | | | | | | | | |
| 25 PDD | no | 2* | | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | C TC | | | | | | | | | | |

B

| Virus ^a | Presencia de suero homólogo ^b | Número de pasaje de ^c | Secuencia aminoacídica del sitio antigénico A | | | | | | | | | | |
|--------------------|--|----------------------------------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 140 | 140a | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 |
| Desafío | no | 3* 10 | V | R | R | G | D | L | A | H | L | A | A |
| 9 PTD | no | 3* | G | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | G | | | | | | | | | | |
| 40 PDD | no | 3* | | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | P | | | | | | | | | | |
| 25 PDD | no | 2* | | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | P S | | | | | | | | | | |

A partir de las preparaciones virales provenientes de 10 pasajes en células RFB de los virus variantes y del virus del desafío en presencia de sueros bovinos, se extrajo ARN viral, se amplificó la región correspondiente al sitio antigénico A, se determinó la secuencia nucleotídica promedio (A) y se dedujo la correspondiente secuencia aminoacídica (B).^a Virus variantes que se sometieron a los pasajes seriados. ^b Sueros provenientes de la sangre post *booster* obtenidos de los animales de donde se aislaron los virus variantes. no: pasajes virales en ausencia de suero homólogo, si: pasajes virales en presencia de suero homólogo. ^c Número de pasajes de las poblaciones virales en ausencia o presencia de suero homólogo. * población viral original con la que se inició el experimento. Se indican las sustituciones nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de las poblaciones virales recuperadas respecto de la secuencia del virus del desafío. T/C indica la presencia de una banda doble en la posición correspondiente

Tabla 18: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la región correspondiente al sitio antigénico A de las poblaciones virales recuperadas luego de 10 pasajes seriados en células BHK-21 en presencia o ausencia de presión inmune

A

| Virus ^a | Presencia de suero homólogo ^b | Número de pasaje de pasaje ^c | Secuencia nucleotídica del sitio antigénico A | | | | | | | | | | |
|--------------------|--|---|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 140 | 140a | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 |
| Desafío | no | 3* 10 | GTG | CGT | AGG | GGA | GAT | CTA | GCC | CAT | CTG | GCG | GCG |
| 9 PTD | no | 3* | G | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |
| 40 PDD | no | 3* | C | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |
| 25 PDD | no | 2* | C | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |

B

| Virus ^a | Presencia de suero homólogo ^b | Número de pasaje de pasaje ^c | Secuencia aminoacídica del sitio antigénico A | | | | | | | | | | |
|--------------------|--|---|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 140 | 140a | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 |
| Desafío | no | 3* 10 | V | R | R | G | D | L | A | H | L | A | A |
| 9 PTD | no | 3* | G | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |
| 40 PDD | no | 3* | P | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |
| 25 PDD | no | 2* | P | | | | | | | | | | |
| | si | 10 10 | | | | | | | | | | | |

A partir de las preparaciones virales provenientes de 10 pasajes en presencia o ausencia de suero homólogo en células BHK-21 de los virus variantes y del virus del desafío, se extrajo ARN viral, se amplificó la región correspondiente al sitio antigénico A, se determinó la secuencia nucleotídica promedio (A) y se dedujo la correspondiente secuencia aminoacídica (B).^a Virus variantes que se sometieron a los pasajes seriados. ^b Sueros provenientes de la sangría post *booster* obtenidos de los animales de donde se aislaron los virus variantes. no: pasajes virales en ausencia de suero homólogo, si: pasajes virales en presencia de suero homólogo. ^c Número de pasajes de las poblaciones virales en ausencia o presencia de suero homólogo. * población viral original con la que se inició el experimento. Se indican las sustituciones nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de las poblaciones virales recuperadas respecto de la secuencia del virus del desafío.

II.6 Caracterización de las variantes virales con un panel de anticuerpos monoclonales continuos y discontinuos generados contra VFA de serotipo C

II.6.a Caracterización antigénica mediante ensayos de ELISA

Para evaluar si las sustituciones aminoacídicas encontradas en las variantes virales en la región correspondiente al sitio antigénico A producían cambios en su antigenicidad, se realizaron ensayos de ELISA donde cantidades equivalentes de cada variante viral se enfrentaron a un panel de anticuerpos monoclonales (AcM) generados contra virus C (Tabla 3 Materiales y Métodos). Estos AcM están dirigidos contra diferentes epitopes dentro del sitio antigénico A (anticuerpos monoclonales continuos) o contra epitopes discontinuos presentes en el sitio antigénico D o no mapeados (anticuerpos monoclonales discontinuos). Los AcM utilizados dirigidos contra el sitio A reconocen epitopes inmunológicamente similares a los reconocidos por AcM generados en huéspedes naturales (Mateu y col., 1995). Estas observaciones validan la utilización de AcM para evaluar la importancia de sustituciones aminoacídicas dentro del sitio A.

Para cada uno de los anticuerpos monoclonales se calculó la reactividad relativa de cada variante viral respecto al virus del desafío (R_i).

Los resultados presentados en la Figura 15 mostraron que la reactividad de la variante viral L9 PTD (R (141) →G) fue similar a la del virus del desafío para todos los AcM continuos y discontinuos evaluados. La alta conservación del triplete RGD en los diferentes aislamientos de VFA sugiere que esta región es importante desde el punto de vista funcional interviniendo en la unión de la partícula viral a la célula susceptible. Sin embargo, los perfiles de reactividad obtenidos con AcM sugieren que el triplete RGD no es importante en la antigenicidad de la partícula viral.

La sustitución L(147)→P fue responsable de la pérdida de reactividad de la variante viral 40 PDD frente al AcM 7JD1 y a la disminución de la reactividad frente a los anticuerpos 7FC12, 7CA8, 7CA11 y 7EE6, todos ellos dirigidos contra epitopes del sitio antigénico A. El comportamiento de esta variante viral fue similar a la del virus del desafío cuando se utilizaron AcM dirigidos contra epitopes discontinuos lo cual indica que las variaciones en el sitio antigénico A no producen modificaciones sobre el sitio antigénico D.

Las variantes virales L12 PTD y 25 PDD que presentan la sustitución L(144)→P mostraron disminución en la reactividad frente a los AcM 7AB5 y 7JD1 y pérdida de reactividad frente al AcM 7FC12, todos ellos dirigidos contra el sitio antigénico A. Los

perfiles de reactividad de estas variantes frente a AcM discontinuos fue similar a la del virus del desafío excepto para el AcM 1BH8 con el que se observó una disminución de la reactividad. Este AcM no se ha mapeado y presenta sensibilidad al tratamiento con tripsina, lo que indica que reconocería la región del sitio antigénico A de la proteína VP1 que es clivada con tripsina (Wild y col., 1967).

Para estos ensayos se utilizaron preparaciones virales obtenidas por 3 pasajes sucesivos en células RFB de las variantes L9 PTD, 40 PDD y L12 PTD y preparaciones virales provenientes de 2 pasajes en RFB de la variante 25 PDD. En todos los casos se corroboró la homogeneidad de las poblaciones virales utilizadas por secuenciación de la región correspondiente al sitio antigénico A. La variante viral L5 PTI no se incluyó en estos experimentos porque no se dispuso de poblaciones homogéneas de la misma.

En ningún caso se observó ganancia de reactividad de alguno de los virus variantes respecto del virus del desafío con los AcM analizados. Tampoco hubo ganancia de reactividad de los virus variantes con AcM que no reaccionan con el virus del desafío (AcM discontinuos 4D7 y 8E8 y AcM 7JA1 dirigido contra el sitio C, datos no mostrados).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15.

II.6.b Caracterización antigénica mediante ensayos de neutralización de la infectividad viral

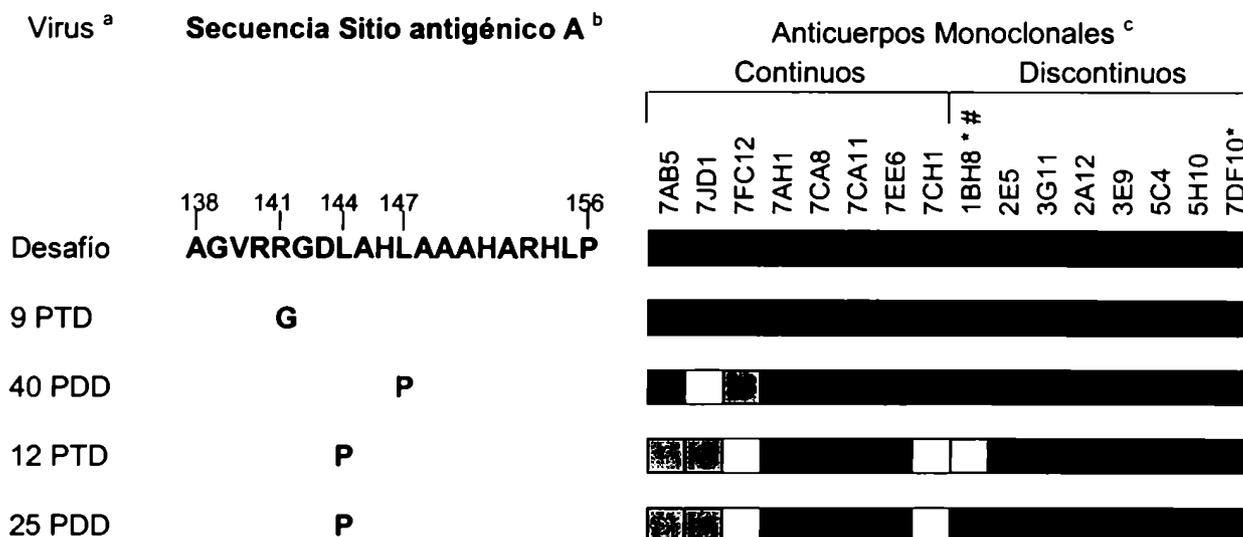
Con el fin de evaluar el efecto de las sustituciones aminoacídicas L(147)→P y R(141)→G en la neutralización de la infectividad viral, se compararon las reactividades de las variantes virales L9 PTD y 40 PDD y del virus del desafío en ensayos de neutralización de la infectividad con un panel de 18 AcM neutralizantes generados contra VFA de serotipo C. Se determinó el título neutralizante 50% de cada AcM para los virus variantes y para el virus del desafío y se calcularon las correspondientes reactividades relativas (R_i) de las variantes 40 PDD y L9 PTD respecto del virus del desafío (Figura 16).

La sustitución L(147)→P presente en la variante 40 PDD fue responsable de la pérdida de reactividad con 5 de los 6 AcM evaluados dirigidos contra epitopes continuos (7JD1, 7FC12, 7CA8, 7CA11 y 7EE6), en tanto que la sustitución R(141)→G, presente en la variante L9 PTD sólo afectó el reconocimiento del AcM 7AB5, cuya reactividad no se vio afectada con la variante 40 PDD. Estos resultados conjuntamente con las reactividades determinadas mediante ensayos de ELISA, sugieren que las sustituciones L(147)→P y R(141)→G se encuentran en dos epitopes independientes dentro del sitio A.

Al igual que en los ensayos de ELISA, no se observaron diferencias en la reactividad de las variantes virales y el virus del desafío con el panel de AcM neutralizantes dirigidos contra epitopes discontinuos ni se observó ganancia de reactividad de las variantes virales cuando se utilizaron AcM que no neutralizan al virus C3 Arg85 (AcM 7CH1, 7AH1, SD6, 3G11, 2E5, 4D7, datos no mostrados).

En general, se encontró una buena correlación cuando se compararon las reactividades de las variantes virales L9 PTD y 40 PDD en los ensayos de ELISA y de neutralización de la infectividad con el panel de AcM utilizados. Los AcM que mostraron una disminución (7FC12, 7CA8, 7CA11 y 7EE6) o pérdida de reactividad (7JD1) frente a la variante 40 PDD en ensayos de ELISA fueron incapaces de neutralizar la infectividad de esta variante viral. Sin embargo, a pesar de que la reactividad del AcM 7AB5 es la misma con la variante L9 PTD (R(141)→G) que con el virus del desafío en ensayos de ELISA, se observó una disminución de la reactividad en la variante L9 PTD con este AcM en ensayos de neutralización. Esta diferencia puede deberse a que la sustitución R(141)→G no impide la unión de 7AB5 pero afecta su capacidad neutralizante. Además, el virus C2 Pando Uruguay 44, que presenta la misma secuencia variante que el virus L9 PTD (RGGD), muestra una pérdida de reactividad frente al AcM 7AB5 pero reacciona eficientemente con los AcM 7CA11, 7CA8, 7JD1, 7FC12, 7AH1 y 7EE6, el mismo perfil de reactividad observado para la variante L9PTD (Martinez y col., 1991, Mateu y col., 1994). Estos resultados correlacionan con los observados en los ensayos de neutralización de la variante L9PTD con sueros policlonales generados en animales vacunados con péptidos sintéticos (Punto II.5.a de Resultados), en los que los diferentes sueros policlonales neutralizaron esta variante con títulos altos o intermedios.

Figura 15: Caracterización de las variantes virales en ensayos de ELISA con anticuerpos monoclonales



Cantidades semejantes de las preparaciones de virus variantes se enfrentaron a un panel de anticuerpos monoclonales en ensayos de ELISA. ^a Los virus variantes utilizados en estos ensayos provienen de 3 pasajes en células RFB, excepto el virus 25 PDD que provino de 2 paajes en células RFB. ^b Se detalla la secuencia del sitio antigénico A del virus utilizado en el desafío de bovinos y se indican las sustituciones aminoacídicas de los virus variantes. ^c Los anticuerpos monoclonales fueron inducidos por virus de serotipo C. Continuos: reconocen epitopes secuenciales dentro del sitio antigénico A. Discontinuos: reconocen epitopes no secuenciales. * indica anticuerpos monoclonales no mapeados. # Anticuerpo monoclonal sensible al tratamiento con tripsina. Las reactividades relativas se calcularon como se describe en Materiales y Métodos (Punto 16).

■ Reactividad positiva ($R_i > 0,1$), ■ Reactividad intermedia ($0,01 < R_i < 0,1$), ■ Reactividad débil ($0,001 < R_i < 0,01$) y □ Reactividad negativa ($R_i < 0,001$). Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes.

Figura 16: Caracterización de las variantes virales en ensayos de neutralización de la infectividad viral con anticuerpos monoclonales

| Virus ^a | Secuencia Sitio antigénico A ^b | Anticuerpos Monoclonales ^c | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---|---------------------------------------|------|-------|------|-------|------|--------------|------|-----|-----|------|-----|
| | | Continuos | | | | | | Discontinuos | | | | | |
| | | 7AB5 | 7JD1 | 7FC12 | 7CA8 | 7CA11 | 7EE6 | 1BH8 # | 2A12 | 3E9 | 5C4 | 5H10 | 1G5 |
| Desafío | AGVRRGDLAHLAAAHARHLP 138 141 147 156 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 9 PD | G | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 40 AD | P | ■ | □ | □ | □ | □ | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

Aproximadamente 100 ufp de los virus variantes se enfrentaron a un panel de anticuerpos monoclonales en ensayos de neutralización de la infectividad viral, se calcularon los títulos seroneutralizantes 50% de cada anticuerpo monoclonal para cada variante viral y se determinaron las reactividades relativas de los virus variantes respecto del virus del desafío, como se detalla en Materiales y Métodos. ^a Los virus variantes utilizados en los ensayos provienen de 3 pasajes en células RFB. ^b Se detalla la secuencia del sitio antigénico A del virus utilizado en el desafío de bovinos y se indican las sustituciones aminoacídicas de los virus variantes. ^c Los anticuerpos monoclonales fueron inducidos por virus de serotipo C. Continuos: reconocen epitopes secuenciales dentro del sitio antigénico A. Discontinuos: reconocen epitopes no secuenciales. # Anticuerpo monoclonal sensible al tratamiento con tripsina.

■ Reactividad positiva ($R_i > 0,1$), ■ Reactividad intermedia ($0,01 < R_i < 0,1$), ■ Reactividad débil ($0,001 < R_i < 0,01$) y □ Reactividad negativa ($R_i < 0,001$). Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes.

El conjunto de resultados obtenidos mediante la utilización de AcM en ensayos de ELISA y de neutralización de la infectividad viral permitió identificar un grupo de AcM (7CA8, 7CA11 y 7EE6) que interaccionan con un epítopo que involucra la posición 147, otro grupo de AcM (7FC12 y 7JD1) que reconocen un epítopo que incluye las posiciones 144 y 147 y el AcM 7AB5 que reconoce un epítopo que involucra las posiciones 141 y 144 del sitio antigénico A.

De los resultados mostrados se desprende que una única sustitución aminoacídica (L(147)→P) en el sitio antigénico A puede tener un efecto muy importante en la antigenicidad del VFA y afectar varios epitopes involucrados en la neutralización de la infectividad viral. Estos resultados correlacionan con los obtenidos al enfrentar la variante 40 PDD con sueros policlonales provenientes de animales vacunados con péptidos sintéticos (Punto II.5.a de Resultados).

V. Discusión

I. La vacunación con péptidos sintéticos

Las vacunas convencionales contra el VFA, producidas por inactivación química de virus crecido en cultivos celulares o en epitelio lingual bovino (Barteling y Vreeswijk, 1991), han demostrado ser eficientes en el control y erradicación de la FA. Sin embargo, en países donde se ha controlado la enfermedad y están en etapa de erradicación, el uso de dichas vacunas presenta serias desventajas relacionadas con el riesgo de reintroducción de la enfermedad por manipulación de virus infeccioso en la producción de vacunas o por inactivación incompleta del antígeno. Estos problemas fueron relacionados con la aparición de brotes en Europa durante la década del 80 (Beck y Strohmaier, 1987).

Estas y otras desventajas asociadas a las vacunas convencionales han llevado a la búsqueda de vacunas alternativas más seguras y eficaces que reemplacen a las vacunas inactivadas. Una de estas alternativas es la utilización de péptidos sintéticos.

Existen varias razones que muestran el potencial de los péptidos sintéticos como vacunas: su composición química definida y simplicidad, su alta estabilidad y la capacidad de estimular una respuesta inmune específica mediante la elección e incorporación de epitopes adecuados. Además, se han desarrollado con éxito vacunas peptídicas contra el parvovirus canino y el virus de la enteritis del visón, capaces de inducir una respuesta protectora en el huésped natural luego del desafío con virus infectivo (Langeveld y col., 1994, Langeveld y col., 1995).

Para que los péptidos sintéticos actúen como inmunógenos efectivos es necesario que contengan epitopes de reconocimiento de linfocitos B apropiados para la inducción de anticuerpos y sitios de reconocimiento para células T capaces de activar linfocitos T colaboradores y estimular células de memoria que provean una respuesta inmune de larga duración. Por esta razón, el diseño adecuado en la composición de epitopes a incluirse en las vacunas peptídicas es uno de los problemas más importantes a resolver, e involucra la identificación de las secuencias aminoacídicas capaces de promover una respuesta inmune protectora.

Si bien diferentes grupos de investigación demostraron que la inmunización de animales de experimentación con péptidos sintéticos derivados del VFA induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes y protección frente al desafío viral (Bittle y col., 1982, Doel y col., 1988, Doel y col., 1990, Doel y col., 1992, Zamorano y col., 1994, Zamorano y col., 1995), los primeros experimentos exitosos de protección de bovinos fueron los reportados por DiMarchi y colaboradores (1986). En estos experimentos se utilizó un péptido de 40

aminoácidos que incluía las regiones 141-158 y 200-213 de la proteína VP1 del VFA O1 Kaufbeuren, unidas por un espaciador de prolinas y con el agregado de cisteínas terminales (Cys-Cys-200-213-Pro-Pro-Ser-141-158-Pro-Cys-Gly). Los autores especularon que el agregado de estos residuos, además de aumentar el tamaño del péptido, permitiría la interacción de los dos sitios mediante la adopción de una estructura secundaria semejante a la que ocurre en la partícula viral. Las cisteínas terminales podrían permitir la polimerización de las moléculas y la posible adopción de estructuras cíclicas que eliminarían la necesidad de una proteína *carrier*.

Debido a los altos costos inherentes a evaluar vacunas contra el VFA en sus huéspedes naturales, la mayor parte de los experimentos de vacunación con péptidos sintéticos fue desarrollada en animales de experimentación y los resultados mostraron que los péptidos sintéticos son efectivos en despertar una respuesta inmune protectora. Sin embargo, los escasos experimentos de vacunación de bovinos y porcinos con péptidos sintéticos fueron menos concluyentes. Además, los estudios de inmunogenicidad de péptidos sintéticos en los huéspedes naturales fueron desarrollados con un bajo número de animales y los péptidos utilizados contenían regiones de VP1 reconocidas principalmente como epitopes fuertes para células B.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar y caracterizar la respuesta inmune y la protección al desafío viral inducida por inmunización de bovinos con péptidos sintéticos simples y más complejos, que incluyen epitopes para células B y T del VFA C3 Argentina 85. Para ello, se analizaron diferentes condiciones de inmunización como la dosis de péptido inoculada, la variación en los tiempos de inoculación y el efecto de aplicar una dosis refuerzo, en un número muy grande de bovinos (138 bovinos en total), con el objeto de dar consistencia a los resultados presentados.

I.1 Evaluación de la protección conferida a bovinos por péptidos sintéticos que representan secuencias del VFA C3 Argentina 85.

Al igual que en las vacunas convencionales contra el VFA, la respuesta inducida por péptidos sintéticos libres está influenciada por el adyuvante que se utilice en la formulación de las vacunas (Francis y col., 1987). Las vacunas peptídicas utilizadas en estos experimentos fueron formuladas en el adyuvante oleoso que se utiliza en las vacunas convencionales e inoculadas por vía subcutánea. En cambio, los resultados de protección de bovinos reportados por DiMarchi y colaboradores (1986) se obtuvieron con

vacunas peptídicas emulsionadas en adyuvante completo de Freund, que es un inmunomodulador muy fuerte cuyo uso no está aceptado para las vacunas convencionales.

En las condiciones experimentales utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo, todos los péptidos sintéticos evaluados (Tabla 1 de Materiales y Métodos) fueron capaces de inducir en bovinos una respuesta específica de anticuerpos neutralizantes y protección frente al desafío con virus homólogo (Tablas 6 a 10 de Resultados).

En todos los experimentos de vacunación en los que se evaluó protección al desafío se inocularon con los distintos péptidos sintéticos un total de 90 bovinos, de los cuales un 29% resultó protegido frente al desafío con 10.000 dosis infectivas 50% ratón lactante de virus homólogo inoculadas por vía intradermolingual (Figura 6 de Resultados). Los bovinos control vacunados con virus inactivado químicamente alcanzaron niveles de protección mayores al 90%. Los mayores niveles de protección se alcanzaron con el péptido ACT (39%) seguido por el péptido AT (28%), AC (25%) y por último el péptido A (23%) (Figura 6). Sin embargo, los niveles de protección conferidos por cada uno de los péptidos sintéticos fueron variables en los diferentes experimentos (Tabla 11). En una experiencia, el péptido ACT protegió al 60% de los bovinos inmunizados (Tabla 9 y 11) mientras que en otra sólo protegió al 25% (Tabla 7 y 11). En todos los experimentos descritos, el desafío viral se realizó por inoculación intradermolingual de 10.000 DIRL50% como exigen las pruebas de potencia de las vacunas convencionales antiaftosa en la Argentina (Barteling y Vreeswijk 1991).

Si bien los experimentos de DiMarchi y colaboradores (1986) demostraron que las vacunas peptídicas son capaces de proteger bovinos frente al desafío con VFA O1K, el número limitado de animales utilizado en esos experimentos (12 bovinos) no permite sacar conclusiones sobre la eficacia de las vacunas peptídicas contra el VFA. Los resultados presentados en esta tesis constituyen el primer estudio de la inmunogenicidad de vacunas peptídicas contra VFA de serotipo C3 utilizando un alto número de bovinos que permite extraer conclusiones consistentes.

1.2 Efecto de diferentes condiciones de inmunización en la respuesta inmune y protección conferida por péptidos sintéticos

Para evaluar el efecto de la dosis de péptido en la respuesta inmune y en los niveles de protección alcanzados, se inmunizaron bovinos con 1 mg ó 0,1 mg de péptido A o

cantidades equimolares de los péptidos AC, AT o ACT (Tablas 6 y 7). En general, no se observó un efecto dosis-respuesta importante.

DiMarchi y colaboradores (1986) mostraron una relación directa entre la dosis utilizada y los niveles de protección alcanzados en bovinos luego de una única inoculación de péptidos con secuencias del serotipo O. En las experiencias descritas en esta tesis la protección frente al desafío se evaluó luego de que los animales recibieran una dosis refuerzo. Además, experimentos de vacunación de cobayos con péptidos sintéticos de la forma Cys-Cys-(VFA aa200-213) Pro-Pro-Ser-(VFA aa141-158) Pro-Cys-Gly con las secuencias correspondientes a los serotipos A, O y C (Doel y col., 1990), mostraron que la protección frente al desafío con virus del serotipo C es más difícil de alcanzar que con virus de los serotipos A y O. Esta podría ser una de las razones por las los niveles de protección obtenidos al vacunar bovinos con dos inoculaciones de péptido AC del serotipo O (DiMarchi y col., 1996) fueron mayores que los obtenidos en este trabajo (Tabla 7).

Como ya se mencionó, en todos los experimentos de vacunación descriptos en este trabajo, los bovinos recibieron una dosis refuerzo o *booster* y para todos los péptidos utilizados se observó una tendencia al aumento de los títulos seroneutralizantes luego del *booster*. Este efecto fue menos importante en los bovinos vacunados con péptido A. Con excepción del péptido A e independientemente de la dosis de péptido, cuando los títulos seroneutralizantes luego de la primovacunación fueron bajos el efecto *booster* fue mayor. Estos resultados sugieren que el efecto de la dosis se “enmascara” cuando los bovinos reciben una segunda inoculación. Resultados similares se desprenden de los experimentos de DiMarchi y colaboradores (1986) donde los bovinos que fueron revacunados resultaron protegidos con dosis de péptido que no confirieron protección en ausencia de *booster*.

Al evaluar el efecto de las modificaciones en los tiempos de vacunación y desafío se observó una tendencia del péptido A a inducir títulos seroneutralizantes y niveles de protección mayores cuando el intervalo de tiempo entre la primera vacunación y el *booster* y entre el *booster* y el desafío fue mayor (Tablas 6, 7 y 10 y Figura 5). En cambio, la respuesta inmune inducida por el péptido más complejo ACT fue menos afectada por la variación en los esquemas de vacunación, especialmente en los niveles de anticuerpos neutralizantes (Tabla 11). Es posible que estos resultados se deban a que en esta construcción peptídica se encuentre representado un espectro mayor de epitopes B y T del VFA.

I.3 Relación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección al desafío

En bovinos inmunizados con vacuna clásica (virus inactivado) se observa una buena correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes determinados en ensayos *in vitro* y los niveles de protección frente al desafío (Van Bekkum, 1969, Suttmoller y Vieira, 1980). Sin embargo, en los experimentos desarrollados en esta tesis no fue posible establecer esta correlación en bovinos vacunados con los péptidos sintéticos A, AT, AC o ACT y posteriormente desafiados. Si bien la mayoría de los bovinos protegidos frente al desafío presentaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes, una fracción de los animales con títulos de anticuerpos neutralizantes similares no resultó protegida frente al desafío viral (Tablas 7 a 10). Estos resultados indican que los títulos de anticuerpos neutralizantes en animales vacunados con péptidos sintéticos no permiten predecir el grado de protección y coinciden con los resultados reportados por DiMarchi y colaboradores (1986). Estos resultados sugieren que una gran proporción de los anticuerpos generados en respuesta a los péptidos sintéticos, que son capaces de neutralizar virus infectivo *in vitro*, son incapaces de detener la infección viral *in vivo*, situación que se evidenció también en los datos provenientes de las pruebas de potencia de las vacunas convencionales en las que un número variable de bovinos que presentaba títulos seroneutralizantes bajos resultaba protegido mientras que otros con altos títulos seroneutralizantes resultaban susceptibles (Collen, 1994). Estos resultados confirman que la neutralización de la infectividad viral medida *in vitro* representa sólo parcialmente los mecanismos de inmunidad que confieren protección.

I.4 Relación entre la dosis protectiva 50% en ratón lactante y la protección al desafío

Se ha reportado que los ensayos de inmunización pasiva en ratón lactante correlacionan mejor con la protección que los títulos seroneutralizantes cuando se vacunan bovinos con péptidos sintéticos (Mulcahy y col., 1991), ya que los ensayos de neutralización son selectivos para un tipo particular de anticuerpos mientras que la población de anticuerpos activa *in vivo* es más heterogénea. Utilizando estos ensayos se observó que a concentraciones de AcM incapaces de neutralizar la infectividad viral *in vitro*, se podían proteger ratones lactantes por inmunización pasiva y que para ello era indispensable la presencia de la porción Fc de los anticuerpos, en tanto que la misma es redundante en ensayos de neutralización *in vitro* (McCullough y col., 1986, 1988). Estos resultados sugieren que la eliminación del virus es mediada por anticuerpos a través de la unión de

los complejos antígeno-anticuerpo con receptores para Fc presentes en las células del sistema retículo endotelial.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se determinó la dosis protectora 50% en ratón lactante (DPRL 50%) en los sueros *post booster* de algunos bovinos, a fin de relacionar la protección con los anticuerpos protectivos en ratón lactante. Los animales vacunados con los péptidos A y AT que resultaron protegidos frente al desafío viral presentaron valores variables de DPRL 50%, mientras que todos los bovinos vacunados con el péptido ACT y protegidos presentaron valores altos de DPRL 50% (>4,8). Sin embargo, un bovino con valores similares de DPRL 50% no resultó protegido (Tabla 8), pero es el animal del que se aisló la variante viral con la sustitución L (147)→P (Punto II.3 de Discusión). Estos resultados muestran la imposibilidad de correlacionar la DPRL 50% con la protección de bovinos vacunados con los péptidos sintéticos A y AT. Sin embargo, este parámetro inmunológico fue el que mejor correlación mostró con protección en los bovinos vacunados con péptido ACT. Estos resultados coincidirían parcialmente con los reportados por Mulcahy y colaboradores (1991), que utilizaron un péptido sintético similar al AC y con virus de los serotipos A y O.

I.5 Relación entre las subclases de IgG y la protección al desafío

Existen evidencias que sugieren que la protección frente al desafío viral estaría relacionada con la subclase de IgG inducida y que la capacidad protectora de los diferentes isotipos depende de su actividad funcional y de su interacción con células del sistema inmune (Mulcahy y col., 1990, 1991). Estos autores mostraron que los perfiles de IgG1 e IgG2 presentes en los sueros de bovinos inmunizados con virus vivo o con vacunas a virus inactivado diferían significativamente de los inducidos por las vacunas peptídicas. Propusieron que el efecto de la inducción de anticuerpos de un isotipo inadecuado para mediar opsonización o fagocitosis podía ser negativo o positivo dependiendo de que estos anticuerpos bloquearan la replicación viral o interfirieran en el acceso de los anticuerpos eficaces para la eliminación del virus.

A pesar de estos antecedentes, la falta de correlación entre el nivel de anticuerpos neutralizantes y la protección, no pudo explicarse por las diferencias en los niveles de IgG1 e IgG2 de los sueros de los bovinos inoculados con péptido sintéticos.

En general, los mayores niveles de protección fueron obtenidos con el péptido más complejo ACT. Esto podría sugerir que cuanto más complejo es el péptido, mejor es la respuesta inmune que es capaz de inducir. Sin embargo, Doel y colaboradores (1988) mostraron que a pesar de que un péptido que incluía los epitopes 200-213 y 140-160 de la proteína VP1 del serotipo O resultó más protector que los péptidos que representaban los sitios antigénicos en forma independiente, un péptido de 80 aminoácidos que incluía las regiones 200-213 y 140-160 (aminoácidos 134-213) fue menos efectivo. Estos resultados sugieren que los péptidos sintéticos pueden adoptar conformaciones que difieren de las de la partícula viral entera y que su eficiencia no depende simplemente del tamaño del péptido. Por el contrario, péptidos muy largos pueden ocultar los epitopes importantes para despertar una respuesta inmune humoral adecuada.

Actualmente no existen suficientes evidencias para determinar por qué la respuesta humoral inducida por péptidos sintéticos en bovinos es menos efectiva que la respuesta inmune inducida por el virus entero. Es posible que otros sitios antigénicos no representados en los péptidos utilizados sean necesarios para inducir una respuesta inmune más eficiente. De hecho, mutaciones en el sitio antigénico D mostraron tener un efecto muy drástico en la antigenicidad de virus del serotipo C (Feigelstock y col., 1992, Mateu y col., 1994).

Otra posibilidad es que el repertorio de anticuerpos inducido por las partículas enteras de VFA sea diferente al inducido por un péptido sintético. En este sentido, Francis y colaboradores (1988) mostraron que un péptido sintético representando la secuencia 140-160 de la proteína VP1 del VFA serotipo O1K era capaz de inducir memoria inmunológica frente a la revacunación con el péptido pero no frente al virus entero. Además, Meloen y colaboradores (1989) demostraron que de los sueros generados en cobayos contra un péptido sintético que representa la región 133-160 de la proteína VP1 del VFA de serotipo A10, sólo un 10 a 30% de los anticuerpos reaccionan con el virus entero.

Otra explicación posible podría ser que los bajos niveles de protección conferidos por vacunas peptídicas en bovinos se deba a la especificidad de los anticuerpos inducidos. Sin embargo, la especificidad de los anticuerpos inducidos en bovinos y en cobayos es indistinguible, a pesar de que los cobayos se protegen más fácilmente que los bovinos (Doel y col., 1992). Más aún, a pesar de que en las vacunas peptídicas no están representados todos los epitopes presentes en la partícula viral entera, el péptido sintético

utilizado por DiMarchi y colaboradores (1986) indujo una respuesta inmune heterotípica en bovinos y cobayos (Doel y col., 1990).

También es posible que los anticuerpos inducidos por las vacunas peptídicas tengan menor afinidad por el virus que aquellos inducidos por la partícula viral entera, ya que sólo los anticuerpos de alta afinidad son capaces de proteger ratones por inmunización pasiva mientras que los anticuerpos de baja afinidad sólo serían capaces de neutralizar al virus *in vitro* (McCullough y col., 1986).

I.6 Relación entre los índices de linfoproliferación y la protección frente al desafío

Existen numerosas evidencias que indican que la protección contra el VFA depende de que la activación de las células T sea efectiva y que el antígeno sea bien presentado al sistema inmune. Los bajos niveles de protección alcanzados con vacunas peptídicas podrían estar relacionados con las restricciones impuesta por los genes del CMH y los péptidos sintéticos serían inmunogénicos sólo en aquellos animales cuyos alelos del CMH fueran capaces de presentarlos eficientemente.

Francis y colaboradores (1987) demostraron que la restricción genética en ratones no respondedores a la inmunización con un péptido que representaba la región 140-160 de la proteína VP1, podía superarse mediante la adición de epitopes foráneos para células T. Posteriormente, también fue posible determinar que la incapacidad de los bovinos de responder a un péptido determinado podía superarse mediante el agregado de epitopes para células T presentes en el VFA. Collen y colaboradores (1991), identificaron un epítope para células T situado entre los residuos 21 y 40 de la proteína VP1 del VFA O1 Kaufbeuren y determinaron que la respuesta inducida era de tipo T cooperadora. El epítope T descrito por Collen es el que se incluyó en los péptidos sintéticos descritos en la Tabla 1 (Materiales y Métodos). En los experimentos de vacunación descritos en este trabajo se observó una alta variación individual en la respuesta de anticuerpos neutralizantes y en la protección. Los péptidos AT y especialmente ACT indujeron los mayores títulos de anticuerpos neutralizantes promedio *post booster*, en tanto que la inmunización con el péptido A indujo títulos de anticuerpos neutralizantes más bajos y variables a lo largo de los diferentes experimentos de vacunación (Tabla 11). Estos resultados sugieren que la adición de epitopes T fuertes en las construcciones peptídicas mejora la respuesta inmune humoral inducida.

Cuando se evaluaron los índices de estimulación de las células mononucleares de sangre periférica obtenidas en las sangrías *post booster* se observó que los linfocitos

provenientes de la mayoría de los animales que resultaron protegidos frente al desafío viral proliferaron en respuesta al VFA entero. Sin embargo, algunos animales que presentaron índices de estimulación positivos no resultaron protegidos frente al desafío viral (Tablas 7 y 8). La inclusión del epítotope T en las construcciones peptídicas mostró ser efectiva en inducir una respuesta proliferativa, ya que de los animales evaluados, sólo 3/9 animales vacunados con péptido A y 3/12 animales vacunados con péptido AC presentaron índices de estimulación positivos frente al virus entero, en tanto que el número de animales vacunados con los péptidos AT y ACT que presentaron índices de estimulación positivo fue mayor (8/13 y 7/11, respectivamente, Tablas 6, 7 y 8). La proliferación de los linfocitos de algunos de los animales vacunados con péptido A frente al virus entero contradice los resultados reportados por Van Lierop y colaboradores (1995). Estos autores mostraron que los linfocitos de animales inmunizados con un péptido que representaba las secuencias 140-160 de la proteína VP1 del VFA de serotipo A eran incapaces de proliferar en respuesta al virus entero. Sin embargo, esta discrepancia puede deberse a múltiples causas, tanto inherentes al virus (diferencias en la secuencia aminoacídica de esta región entre los virus del serotipo A y C) como al huésped (diferentes haplotipos del CMH o a las razas de bovinos utilizadas). Estos resultados sugieren que no sólo los péptidos AT y ACT sino también los péptidos A y AC contienen epítotope para células T, pero éstos no serían eficaces para inducir altos niveles de protección. Por esta razón, es necesario realizar un diseño adecuado en cuanto a la combinación y orientación de epítotope para células B y T en las vacunas peptídicas. En este sentido, Partidos y colaboradores (1991), mediante inoculación de ratones con péptidos sintéticos representando secuencias del virus del sarampión demostraron que si el epítotope para células T estaba localizado en la región carboxilo terminal respecto del epítotope B, se inducían anticuerpos específicos contra el epítotope T y no para el epítotope B.

En conjunto, los resultados presentados muestran que todos los péptidos sintéticos evaluados fueron capaces de inducir una respuesta inmune específica y protectora en bovinos. Sin embargo, no fue posible establecer una correlación directa entre la protección conferida por las diferentes construcciones peptídicas utilizadas y los parámetros inmunológicos estudiados.

I.7 Influencia de la composición de alelos del exón II del gen DRB3 de clase II de la población de bovinos en la respuesta inmune inducida por péptidos sintéticos

La baja eficacia de las vacunas peptídicas evidenciada a través de los diferentes parámetros inmunes evaluados en este trabajo, puede deberse a la gran variación individual en la respuesta inmune. Es de esperar que las variaciones en la respuesta inmune individual de los bovinos aumenten cuando se incluye en las vacunas un repertorio más limitado de epitopes para células B y T. Esto se debe a que el polimorfismo de los genes del CMH clase II puede afectar el reconocimiento de los epitopes individuales. En consecuencia, las vacunas peptídicas deberían diseñarse de manera que incluyan epitopes B adecuados y especialmente epitopes T, que fueran reconocidos por todos los haplotipos del CMH clase II.

La tipificación de los antígenos del CMH clase II de bovinos inmunizados con el péptido sintético utilizado por DiMarchi y colaboradores (1986) mediante la utilización de la técnica de isoelectroenfoque unidimensional, demostró que la especificidad y magnitud de la respuesta T estaba restringida por los alelos del CMH clase II (Glass y col., 1991). Van Lierop y colaboradores (1995) mostraron una clara correlación entre los haplotipos del CMH clase II y la respuesta a un péptido particular.

Para evaluar el rol de los genes del CMH clase II bovino en la respuesta individual observada en los animales vacunados con péptidos sintéticos, se analizó el polimorfismo del exón 2 del gen DRB3. No se observó correlación entre la composición de alelos del locus DRB3 y la protección conferida por los péptidos sintéticos o los títulos neutralizantes (Tabla 12 y Figura 8). Sin embargo, los alelos 24 y 3701 se encontraron solamente en animales que resultaron protegidos frente al desafío. Además, se observó la presencia diferencial de los alelos 12 y 18 en animales que resultaron susceptibles frente al desafío y fueron los alelos más frecuentes en la población de bovinos utilizados en las diferentes experiencias de vacunación. Más aún, los 3 animales homocigotas para el alelo 12 (animales 861, 863 y 869) vacunados con péptido A resultaron susceptibles al desafío. Estos resultados sugieren que este alelo sería ineficiente para presentar al péptido A.

Los resultados provenientes de la tipificación de haplotipos del CMH clase II muestran una gran heterogeneidad en la composición de alelos del gen DRB3 en la población de bovinos utilizada en las experiencias de vacunación, que puede explicar la alta variación en la respuesta inmune observada. Estos resultados sugieren que los epitopes T presentes en las péptidos sintéticos utilizados no son reconocidos por todos los haplotipos presentes en una población de bovinos elegida al azar. Además, es posible que parte de

la variación individual observada se deba a restricciones impuestas por otros genes del CMH clase II, que intervengan en la presentación de epitopes del VFA.

El hecho de que aún no haya sido posible desarrollar una vacuna eficaz basada en el uso de péptidos sintéticos contra el VFA sugiere que se conoce más acerca de la estructura antigénica del virus que de la inducción, regulación y de los mecanismos de la respuesta inmune en los huéspedes naturales.

II. Mutantes de escape aisladas de bovinos vacunados con péptidos sintéticos

Los virus cuyo genoma está compuesto de ARN, como el VFA, son altamente heterogéneos y existen en una distribución compleja y dinámica de genomas relacionados pero no idénticos denominada cuasiespecies (Domingo y col., 1978). Durante la replicación, constantemente se generan genomas mutantes que son sometidos a un proceso de selección y competencia. La mayoría se mantienen en bajas frecuencias y algunos son eliminados. La presencia de este reservorio dinámico de mutantes es importante en la adaptabilidad del virus y explica las dificultades en el diseño de vacunas efectivas (Domingo y col., 1994).

Al problema derivado de la representación de un número limitado de epitopes en las vacunas peptídicas se suma la heterogeneidad genética extrema de los virus a ARN que hace aún más complicado el diseño de vacunas peptídicas contra virus a ARN. Los anticuerpos inducidos por el repertorio de epitopes representado en las vacunas peptídicas pueden permitir el escape de mutantes virales y ser inefficientes en detener la infección. Sin embargo, es posible especular que la inclusión en las vacunas peptídicas de epitopes presentes en diferentes sitios antigénicos de los virus a ARN permitiría conferir protección, debido a que el número de mutantes de escape sería lo suficientemente bajo como para no poder sostener una infección viral. Esto explicaría los altos niveles de protección conferidos por las vacunas convencionales contra el VFA, en las que están representados todos los sitios antigénicos.

En este trabajo se analizaron 29 lesiones provenientes de 14 bovinos vacunados con péptidos sintéticos que no se protegieron frente al desafío con virus infectivo, y en 12 de ellas se aislaron poblaciones virales con sustituciones aminoacídicas únicas en la región correspondiente al sitio antigénico A (Tabla 13). Una sustitución, R(141)→G, afectó al motivo RGD, altamente conservado en los diferentes serotipos del VFA e involucrado en el reconocimiento del receptor celular (Fox y col., 1989, Mason y col., 1994). En 8 lesiones provenientes de 4 animales, se aislaron virus con la sustitución L(144)→P. Todos los aislamientos de campo de serotipo C secuenciados hasta el momento, la mayoría de los virus de serotipo O y algunos de serotipo A presentan leucina en la posición 144 (Mateu y col., 1994, Cheung y col., 1983). Sin embargo, esta posición fue altamente heterogénea en clones virales provenientes del VFA A12 (Rowlands y col., 1983). Finalmente, en 3 lesiones provenientes de 2 animales se aislaron virus con la sustitución L(147)→P,

adyacente a una posición crítica en la antigenicidad del VFA de serotipo C (Fielgestock y col., 1996). Si bien existen evidencias que sugieren que existe variación antigénica en ausencia de presión inmune (Sevilla y col., 1996, Mbayed y col., 1997), ninguno de los virus aislados de las lesiones de los animales placebo (12 lesiones provenientes de 6 animales) presentaron cambios en la región correspondiente al sitio antigénico A, indicando que las variantes virales se seleccionaron en presencia de presión inmune. Sin embargo, a pesar de que todos los bovinos fueron inmunizados con el mismo péptido sintético representando el sitio antigénico A, en los diferentes bovinos se ejercieron presiones selectivas distintas que resultaron en la aparición de virus con sustituciones aminoacídicas diferentes.

Además, la aparición de variantes virales con sustituciones únicas en sólo 3 posiciones dentro del sitio antigénico A sugiere la existencia de restricciones en el tipo y número de reemplazos que pueden ser tolerados en la región 140-160 de la proteína VP1 de la cápside viral.

II.1 Análisis de la mutación R(141)→G

La comparación de la secuencia aminoacídica de la región correspondiente al *loop* GH de un alto número de aislamientos de campo y variantes de laboratorio ha demostrado que el VFA es altamente intolerante a sustituciones aminoacídicas en la región del motivo RGD. Además, la relevancia del triplete RGD en el reconocimiento del receptor celular de la célula hospedadora ha sido ampliamente confirmada mediante mutagénesis dirigida o delección de los residuos RGD del VFA (Leippert y col., 1997, Mason y col., 1994, McKenna y col., 1995) y por estudios de inhibición de la unión del VFA por péptidos sintéticos conteniendo la secuencia RGD (Fox y col., 1989).

Sin embargo, en este trabajo fue posible aislar una mutante con la sustitución R(141)→G que afecta al motivo RGD (Tabla 13). Esta misma mutación fue encontrada en el VFA C2 Pando Ur 44 aislado en el campo (Martínez y col., 1991). Recientemente, se reportó la selección de mutantes de escape a la neutralización con el AcM SD6 con sustituciones aminoacídicas en las posiciones 142 y 143 del triplete RGD del VFA C1, que fueron capaces de replicar en cultivo de células (Martínez y col., 1997). Estos ejemplos indican que es posible superar las restricciones a la variación en esta región altamente conservada. Además, se describieron mutantes con sustituciones en la región RGD obtenidas por mutagénesis dirigida a partir de los clones infectivos de los VFA de serotipo

A y O, que ayudaron a evaluar las implicancias de la región RGD en la infectividad del VFA (Rieder y col., 1993, Zibert y col., 1990).

La variante viral con la sustitución R(141)→G fue amplificada mediante pasajes en cultivos primarios (RFB) y en la línea celular BHK-21, y las poblaciones recuperadas conservaron la mutación característica, indicando que esta mutante viral es infectiva en estos dos tipos celulares (Tabla 14). Estos resultados no concuerdan con los reportados por Leippert y colaboradores (1997) que por mutagénesis dirigida del VFA de serotipo O obtuvieron mutantes portando la secuencia GGD en vez de RGD, que eran incapaces de infectar células BHK-21. Estas diferencias podrían atribuirse a la variación de aminoácidos entre los serotipos C y O y posiblemente a la existencia de diferentes mecanismos de unión a la célula huésped (Jackson y col., 1996). Asimismo, la mutagénesis de la arginina del triplete RGD por otros aminoácidos diferentes de glicina en virus de los serotipos A y O produjeron variantes virales de baja infectividad. Más aún, la mayor parte de las mutantes virales generadas a partir de clones infecciosos del VFA de serotipo O o A conteniendo cambios en las otras posiciones del RGD mostraban una disminución muy importante de su infectividad (Mason y col., 1994, Jackson y col., 1996). Cuando la variante viral R(141)→G fue sometida a 10 pasajes seriados en cultivos celulares en ausencia de presión inmune, la población viral recuperada presentó una reversión total a la secuencia del virus parental, lo cual indica que la misma presenta desventajas replicativas respecto al virus parental (Tablas 17 y 18). Por el contrario, Ruiz Jarabo y colaboradores (1999) mostraron que una variante viral de serotipo C portando un motivo RGG en vez de RGD, revertía a RGD con muy baja frecuencia luego de 15 pasajes en cultivos de células a baja *moi*. Más aún, la población RGD no se convirtió en la población dominante, sino que ambas poblaciones virales coexistieron hasta el pasaje número 50. La mutación R(141)→G afectó la capacidad replicativa viral, ya que es evidente el retraso en las primeras horas del ciclo de replicación. Esta mutación en el triplete RGD generó desventajas replicativas en las etapas tempranas de la infección, probablemente afectando la unión al receptor celular. Sin embargo, una vez superada la entrada del virus a las células los títulos virales finales obtenidos fueron semejantes a los del virus parental (Figura 12). Contrariamente, las mutantes resistentes a la neutralización con el AcM SD6 con sustituciones en las posiciones G(142)→E o D(143)→G del VFA C1 no presentaron este comportamiento. Sin embargo, estos virus presentaban otras sustituciones además de las que afectaban la secuencia RGD, que podrían tener un

efecto compensatorio (Martínez y col., 1997). En cambio, la determinación de la secuencia nucleotídica y la deducción de la correspondiente secuencia aminoacídica correspondiente a toda la poliproteína P1 de la variante viral aislada en este trabajo, mostró que la única sustitución respecto del virus parental era R(141)→G (Figura 13).

La viabilidad de la mutante con la sustitución R(141)→G permitió estudiar el comportamiento antigénico de un VFA con una secuencia atípica dentro del sitio antigénico A, que hasta el momento sólo se había estudiado con péptidos sintéticos.

La caracterización antigénica de la mutante R(141)→G mostró que en ensayos de ELISA (Figura 15) la mutación no afectaba la reactividad de ninguno de los AcM evaluados dirigidos contra el sitio antigénico A, mientras que en ensayos de neutralización de la infectividad viral utilizando el mismo panel de AcM, la única reactividad afectada fue la obtenida con el AcM 7AB5 (Figura 16). Estos resultados concuerdan con los perfiles de reactividad obtenidos para el VFA C2 Pando Ur/44 que como se mencionó anteriormente, posee la mutación R(141)→G junto con otras 4 mutaciones respecto del VFA C3 Argentina 85 dentro del sitio A, y cuya reactividad con un panel similar de AcM sólo se vio afectada para el AcM 7AB5 (Martínez y col. 1991, Mateu y col. 1994). Estos resultados indican que la mutación R(141)→G no tiene un efecto drástico en la antigenicidad del VFA y que el AcM 7AB5, que hasta el momento no había sido mapeado, interacciona con la región del RGD.

Más aún, Mason y colaboradores (1994) observaron que mutantes virales del VFA de serotipo A12 con cambios en la región RGD o en los que este triplete había sido deletado, eran capaces de unirse a AcM dirigidos contra el sitio antigénico A, indicando que estas modificaciones no inducían cambios importantes en la antigenicidad de la partícula viral del serotipo A. Contrariamente, Novella y colaboradores (1993) utilizando péptidos sintéticos encontraron que sustituciones en las tres posiciones del triplete RGD resultaban en la pérdida de reactividad de varios epitopes del sitio A de serotipo C1, definidos por AcM. En ese trabajo los autores mostraron que la tolerancia de una sustitución dependía más de cuál fuera el aminoácido que se utilizara en el reemplazo, que de la posición reemplazada y que todas las posiciones dentro del RGD mostraban una contribución importante en el reconocimiento del sitio A por AcM. Además, Verdaguer y colaboradores (1998), mediante estudios de unión de AcM a péptidos sintéticos con sustituciones en la región RGD mostraron que esta región tenía un rol muy importante en la interacción con AcM neutralizantes dirigidos contra el sitio antigénico A

del VFA serotipo C1, aunque la posición 141 parecía ser la más tolerante a sustituciones aminoacídicas. Resultados del mismo grupo mostraron que la sustitución D(143)→G que afecta al triplete RGD, tenía un efecto muy drástico en la antigenicidad de la partícula viral tanto en ensayos de neutralización de la infectividad viral como en ensayos de ELISA competitivos con AcM dirigidos contra el sitio A (Ruiz Jarabo y col., 1999).

Como era de esperar en base a la independencia del sitio antigénico A respecto del resto de los sitios antigénicos en el serotipo C (Lea y col., 1994), la variante R(141)→G no mostró diferencias respecto al virus parental en la reactividad con AcM discontinuos específicos para el sitio antigénico D, en ensayos de ELISA ni de neutralización (Figuras 15 y 16).

Cuando la variante viral R(141)→G fue sometida a sucesivos pasajes en células en cultivo en presencia de una concentración subneutralizante de suero homólogo (el suero del animal en que se había generado), la población viral recuperada conservó la mutación R(141)→G. Además, si bien la variante R(141)→G no fue neutralizada eficientemente por el suero homólogo, sueros bovinos provenientes de otros animales vacunados con péptidos sintéticos la neutralizaron eficientemente. Estos resultados sugieren que esta variante surgió como consecuencia de la composición del suero del animal L9 y no por tratarse de una mutación crítica en la antigenicidad del VFA (Tablas 16, 17 y 18), resultados que concuerdan con los encontrados en los ensayos de ELISA y neutralización con AcM dirigidos contra el sitio A (Figuras 15 y 16).

Debido a que la conformación adoptada por el triplete RGD dentro del *loop* GH es crítica para el reconocimiento del receptor y en vista de las evidencias que sugieren que el VFA de serotipo O utiliza heparán sulfato para interactuar con la célula (Jackson y col., 1996), es posible pensar que la mutación R(141)→G o cualquiera que afecte al triplete RGD, puede alterar el reconocimiento del receptor celular. Esto podría implicar cambios en el tropismo celular, ya que la falta de conservación de la secuencia RGD puede reflejar una relajación de las restricciones estructurales para el reconocimiento de la integrina celular o bien la habilidad del VFA de reconocer otro receptor celular diferente. Esta mutante viral es una herramienta muy valiosa para estudiar la posible utilización del VFA de receptores celulares alternativos a la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Berinstein y col., 1995).

II.2 Análisis de la mutación L(144)→P

El análisis de las secuencias genómicas de un alto número de aislamientos de VFA de serotipo C permitió definir la existencia de dos regiones hipervariables a ambos lados del triplete RGD (Mateu y col., 1990, 1992, Novella y col., 1993, Martínez y col., 1991).

El análisis de los virus recuperados de las lesiones de los bovinos susceptibles al desafío mostró que la sustitución L(144)→P se encontró en 8 de las 29 lesiones estudiadas, siendo la mutación más frecuente.

A pesar de que la mayor parte de los aislamientos de VFA de serotipo C descritos en la literatura presentan leucina en la posición 144 de la proteína VP1, los resultados mostrados en este trabajo indican que esta sustitución es tolerada por el VFA de serotipo C, a pesar de su cercanía al motivo RGD.

En este sentido, varios autores aislaron en el laboratorio VFA con sustituciones aminoacídicas en esta posición para el serotipo C o en posiciones homólogas en otros serotipos. Rowland y colaboradores (1983) encontraron que los cambios en la posición 148 de VP1 del VFA de serotipo A, homóloga a la posición 144 del serotipo C, afectaban la neutralización viral. Resultados similares fueron descritos por Piatti y colaboradores (1995). También se aislaron variantes virales con sustituciones en la posición 144 luego de pasajes seriados en del VFA serotipo C, en ausencia de presión inmune (Sevilla y Domingo, 1996) o luego de 25 pasajes en cultivo, en presencia de presión inmune (Schiappacassi y col., 1995). Sin embargo, en todos los casos antes mencionados, los genomas virales analizados presentaron al menos una sustitución adicional en la proteína VP1. Estas observaciones podrían sugerir que la sustitución única de leucina en la posición 144 sería desventajosa para el virus. De hecho, las poblaciones virales con las sustituciones L(148)→R y L(148)→H, homólogas a la posición 144 del serotipo C, obtenidas a partir del clón infeccioso del VFA de serotipo O1 Kaufbeuren, fueron incapaces de infectar células BHK-21 (Leippert y col., 1997). Sin embargo, las mutantes del serotipo C resistentes al AcM SD6, con sustituciones L(144)→V y L(144)→S no mostraron deficiencias en su capacidad replicativa respecto del virus parental (Martínez y col., 1997). Por otro lado, la transfección de células con mutantes obtenidas a partir del clón infeccioso del VFA serotipo A12, con sustituciones en la posición homóloga a 144, produjeron efecto citopático en células BHK-21 (Mason y col., 1994).

Las evidencias contradictorias respecto de la importancia biológica de cambios aminoacídicos en las regiones que rodean al RGD indicarían que el efecto de la

sustitución depende fuertemente del tipo de cambio involucrado y del contexto aminoacídico de los distintos serotipos.

En el presente trabajo se aislaron mutantes virales que presentaron únicamente la sustitución L(144)→P en toda la región P1 (Figura 13). Las mismas presentaron desventajas replicativas respecto al virus parental, ya que fueron rápidamente reemplazadas por el mismo luego de 2 pasajes en cultivos celulares (Tabla 14).

Asimismo, luego de 10 pasajes seriados de estas variantes virales en cultivos celulares en presencia de los sueros en los que se aislaron, se rescataron poblaciones cuya secuencia promedio correspondió a la del virus parental (Tablas 17 y 18). Si bien los resultados obtenidos sugieren que la presión inmune no tendría un papel importante en la selección de las mutantes L(144)→P, la desventaja replicativa de las mismas puede haber sido la causante de la imposición del virus parental en los pasajes seriados y las condiciones experimentales utilizadas no haber sido las adecuadas para este tipo de variantes virales. Existen evidencias que sugieren que el repertorio de variantes que potencialmente puede volverse dominante en el espectro de cuasiespecies estaría influenciado, entre otros factores, por el tamaño de las poblaciones virales (Sevilla y col., 1996, Ruiz Jarabo y col., 1999). Además, Piatti y colaboradores (1995) encontraron que un clón de VFA de serotipo A12, cuya secuencia promedio en la posición equivalente a la 144 de VP1 del serotipo C3 era una serina, pero que contenía una población minoritaria con leucina en esa posición, resultaba en poblaciones que contenían serina o leucina dependiendo de que las condiciones de infección fueran a alta o baja moi, respectivamente. En base a estos antecedentes y a las desventajas replicativas de las poblaciones virales L12 PTD, L5 PTI y 25 PDD rescatadas de bovinos, es posible especular que el virus del desafío presente en muy baja proporción en estos aislamientos se volviera dominante rápidamente en las condiciones de infección a baja moi utilizadas en estos experimentos. La heterogeneidad de las poblaciones virales rescatadas de las lesiones de los bovinos 25, L12 y L5 no pudo ser detectada por secuenciación del ARN viral presente en las lesiones, lo cual sugiere que el virus parental representaba menos del 10% de la población viral (Meyer y col., 1995).

Diferentes condiciones de infección y selección por presión inmune deberán ensayarse para intentar entender los mecanismos involucrados en la selección de estas variantes *in vivo*. Presiones selectivas de distinta naturaleza, como las presiones celulares, no pueden ser descartadas en este caso. En este sentido, se observó una relación entre la presencia

de sustituciones en la posición 144 (L(144)→S) del VFA de serotipo C y mayor afinidad por heparina, que se relacionó con posibles alteraciones en el tropismo celular y la virulencia (Baranowsky y col., 1998).

El mapeo de AcM mediante la utilización de péptidos sintéticos solapados mostró que el AcM 7FC12 mapeaba en la región 138 a 143 del sitio A (Mateu y col., 1990). Sin embargo, los experimentos de ELISA con AcM mostraron que la mutación L(144)→P tiene un efecto muy drástico en la reactividad de este AcM, lo que indica que hay que redefinir el lugar de mapeo de este AcM. Resultados similares se describieron en ensayos de ELISAS competitivos con péptidos sintéticos con la sustitución L(144)→P (Verdaguer y col., 1998). Si bien se describió que el AcM 7CA11 interaccionaba con el aminoácido en la posición 144 de VP1 (Mateu y col. 1990, Verdaguer y col., 1998), los datos de ELISA de las mutantes con la sustitución L(144)→P muestran que la misma no afectó la reactividad con este AcM. La disminución de la reactividad de la mutante L(144)→P con el AcM 7JD1 confirma resultados previos en cuanto a que esta posición forma parte del epítipo definido por este AcM (Mateu y col., 1990, Verdaguer y col., 1998). La posición 144 también forma parte de los epítopos definidos por los AcM 7CH1, 1BH8 y 7AB5 (Figura 15). La disminución de la reactividad de estas variantes con los AcM 1BH8 y 7AB5 permite decir que esta posición estaría involucrada en los epítopos reconocidos por estos AcM. De esta forma, estas variantes con sustituciones únicas en la posición 144 de VP1 contribuyeron al mapeo de estos AcM.

Debido al rápido enriquecimiento de las poblaciones virales conteniendo la sustitución L(144)→P con la secuencia del virus parental, no fue posible realizar ensayos de neutralización de la infectividad viral con AcM ni con sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos. Estos ensayos hubieran permitido evaluar los efectos de esta sustitución en la neutralización y estudiar la importancia del suero de los animales en los que seleccionaron estas variantes, en la aparición de las mismas.

II.3 Análisis de la mutación L(147)→P

La comparación de secuencias de un alto número de aislamientos de VFA de serotipo C mostró una alta conservación del aminoácido leucina en la posición 147 de la proteína VP1 (Mateu y col., 1994). En los aislamientos a campo o en clones virales de laboratorio las sustituciones en esta posición fueron acompañadas de otros reemplazos dentro del sitio antigénico A (Sobrino y col., 1986). Más aún, no se han descrito en la bibliografía

mutantes MAR de serotipo C que presenten sustituciones en la posición 147. La importancia de sustituciones en la posición 147 sólo se ha evaluado en forma indirecta mediante el análisis de la interacción de AcM y de sueros de porcinos convalescientes o vacunados, con péptidos sintéticos con sustituciones aminoacídicas en esta posición (Mateu y col., 1995, Mateu y col., 1992). Estos estudios mostraron variabilidad en la capacidad de los sueros porcinos individuales para reconocer los péptidos mutantes y los diferentes aminoácidos sustituidos en la posición 147 tenían efectos distintos en la reactividad con el panel de AcM. Sin embargo, no se evaluaron péptidos con la sustitución L(147)→P.

En este trabajo se aisló una variante viral cuya única sustitución en toda la región P1 fue L(147)→P dentro del sitio antigénico A, en la proteína VP1. Es la primera vez que se describe una variante viral de estas características aislada en el huésped natural del VFA, como consecuencia de la presión inmune. Además, la presencia de esta sustitución se encontró en más de un bovino vacunado con péptidos sintéticos (Tabla 13). Esta variante permitió estudiar la importancia antigénica de esta sustitución en el VFA.

A diferencia de las mutantes con la sustitución L(144)→P, fue posible recuperar poblaciones virales que conservaron la mutación L(147)→P luego de 3 pasajes en células RFB y cuyo título viral fue semejante al del virus del desafío (Tabla 15). Sin embargo, al cabo de 10 pasajes en células en cultivo en ausencia de presión inmune la población recuperada presentó la secuencia promedio del virus parental, lo cual indica una desventaja replicativa de la mutante en relación con la cepa del desafío (Tablas 17 y 18). A pesar de esto, la sustitución L(147)→P no mostró un efecto importante en la capacidad replicativa del VFA evaluada en curvas de crecimiento, excepto un pequeño retardo en las etapas iniciales de la curva (Figura 12).

La caracterización antigénica de la mutante L(147)→P mostró que en ensayos de ELISA, la mutación afectaba la unión de los AcM 7JD1, 7FC12, 7CA8, 7CA11 y 7EE6 dirigidos contra el sitio antigénico A (Figura 15). Estos resultados concuerdan con observaciones previas en cuanto a la participación de la posición 147 de VP1 en los epitopes reconocidos por los AcM antes mencionados (Mateu y col., 1990, Verdaguer y col., 1998). La alteración en la reactividad del AcM 7CA8 observada frente a la mutante L(147)→P indica que la posición 147 forma parte del epitope reconocido por este AcM. El efecto de la sustitución L(147)→P fue aún más drástico al evaluar los perfiles de reactividad de los AcM en ensayos de neutralización de la infectividad viral, ya que los anticuerpos que en

ensayos de ELISA mostraron una reactividad intermedia (7CA8, 7CA11 y 7EE6) o débil (7FC12), en los ensayos de neutralización mostraron una reactividad negativa (Figura 16). Como era de esperar en base a la independencia del sitio antigénico A respecto del resto de los sitios antigénicos en el serotipo C (Lea y col., 1994), la variante L(147)→P no mostró diferencias respecto al virus parental en la reactividad con AcM discontinuos específicos para el sitio antigénico D, en ensayos de ELISA ni de neutralización de la infectividad viral (Figuras 15 y 16).

Cuando la variante viral portando la mutación L(147)→P fue sometida a sucesivos pasajes en células en cultivo en presencia de una concentración subneutralizante de suero homólogo (el suero del animal en que se había generado), la población recuperada conservó la mutación L(147)→P (Tablas 17 y 18). Además, el animal 40, del que se aisló la variante L(147)→P, fue el único animal que presentó una DPRL50% >4,8, que no resultó protegido frente al desafío viral (Tabla 8), no presentó generalización de la infección luego del desafío y las lesiones aparecieron tardíamente (a los 7 y 10 días post desafío). Más aún, en las dos lesiones analizadas se encontraron poblaciones virales con esta sustitución. Estos resultados enfatizan la importancia de la presión inmune en la aparición de la mutante en el animal 40.

Por otro lado, la variante L(147)→P no fue neutralizada por el suero homólogo ni por otros sueros de bovinos vacunados con péptidos sintéticos (Tabla 16 y Figura 14). Estos resultados junto con los observados en los ensayos de ELISA y neutralización con AcM dirigidos contra el sitio A indican que la sustitución L(147)→P tiene un efecto crítico en la antigenicidad del VFA.

Mateu y colaboradores (1990) mostraron que la sustitución H(146)→R era capaz de afectar múltiples epitopes definidos por un panel de AcM dirigidos contra el sitio A. Esta sustitución fue la responsable de la ausencia de reactividad con un panel de AcM contra el sitio A del VFA C5 Argentina 69 (Martínez y col., 1991), de brotes recientes del VFA de serotipo C en Argentina (Feigelstock y col., 1996) y de diferentes mutantes de escape a la neutralización (Martínez y col., 1991). La mutación L(147)→P provoca un efecto semejante, aunque menos drástico. Esto puede deberse a la importancia *per se* de la sustitución L(147)→P o bien a que se encuentra adyacente a la posición 146. En este sentido, la sustitución A(145)→P, adyacente a la posición 146, fue encontrada en poblaciones virales de serotipo C pasadas en cultivos celulares en ausencia de presión

inmune y fue responsable de la disminución en la reactividad con los AcM evaluados dirigidos contra el sitio A (Sevilla y col., 1996).

Los resultados obtenidos al enfrentar las variantes virales con las sustituciones L(144)→P y L(147)→P con el panel de AcM corroboran lo observado por Mateu y colaboradores (1990) en cuanto a la presencia de epitopes múltiples solapados dentro del sitio antigénico A, que resultan afectados por una única sustitución. Estas observaciones muestran que un cambio genético en esta región puede causar un cambio antigénico muy drástico.

Además, la caracterización de las variantes virales con sustituciones únicas en la región codificante para las 4 proteínas estructurales del VFA ejemplifica lo observado por Martínez y colaboradores (1991), en cuanto a que la variación antigénica en el VFA puede ser causada por sustituciones únicas en vez de por acumulación de sustituciones aminoacídicas. Estos resultados enfatizan el gran potencial de adaptación de los virus a ARN en cuanto a que su flexibilidad genética es tal, que les permite prescindir de dominios funcionales altamente conservados.

La disponibilidad de estas variantes virales constituyó una herramienta muy importante para estudiar la importancia de una posición aminoacídica en la antigenicidad del VFA, así como también para realizar un mapeo fino de los epitopes definidos por AcM.

II.4 Posibles razones para explicar la ausencia de protección

Teniendo en cuenta las implicancias de las sustituciones aminoacídicas presentes en las mutantes de escape y la respuesta inmune inducida en bovinos por los péptidos sintéticos analizados en este trabajo, los diferentes resultados de protección podrían resumirse en las siguientes situaciones:

-En algunos bovinos los péptidos sintéticos fueron incapaces de estimular una respuesta inmune eficiente debido, probablemente, a la restricción impuesta por la genética de los mismos para presentar eficientemente los epitopes peptídicos. En consecuencia, los virus aislados de las lesiones de estos animales presentaron la secuencia del virus utilizado en el desafío viral.

-En algunos bovinos los péptidos sintéticos indujeron una estimulación subóptima de la respuesta inmune, de modo que algún epitope peptídico no fue presentado eficientemente permitiendo la selección de variantes de escape. En estos animales el virus aislado de las lesiones presentó sustituciones en la región del sitio antigénico A que resultaron

fácilmente neutralizables por sueros provenientes de diferentes bovinos vacunados con péptidos.

-En algunos animales se generaron variantes virales con sustituciones críticas en la región correspondiente al sitio A que produjeron un cambio muy importante en la antigenicidad de la partícula viral, de modo que la mayoría de los sueros bovinos provenientes de animales vacunados con péptidos sintéticos resultaron incapaces de neutralizar al virus variante. En esta situación, la ausencia de protección en los bovinos no se debería a una deficiencia en la respuesta inmune inducida por los péptidos sintéticos sino más bien a la variante viral en sí misma. Este sería el caso del animal 40. Sin embargo, la misma sustitución se encontró en el animal 858 (Tabla 13) en una de las dos lesiones analizadas. Si la ruptura de inmunidad en este animal se hubiese debido a la aparición de una variante con una mutación crítica, entonces esta variante debería encontrarse en todas las lesiones. Entonces, es posible pensar que sustituciones críticas son responsables de la ruptura de inmunidad en el contexto de un determinado animal (animal 40) pero que la misma sustitución puede no ser la responsable de la ruptura de inmunidad en otro animal (animal 858). De todas formas, la aparición de este tipo de variantes virales representa un riesgo muy grande en la evolución del virus a campo.

-En algunos bovinos los péptidos sintéticos fueron capaces de despertar una respuesta protectora eficiente.

III. Consideraciones finales

En base a los resultados presentados en este trabajo es clara la necesidad de plantear estrategias para intentar mejorar la baja eficiencia de las vacunas peptídicas en los huéspedes naturales. Una de ellas es identificar epitopes para células T que sean reconocidos por una población de bovinos genéticamente heterogénea e incluirlos en las vacunas peptídicas para que cooperen adecuadamente en la inducción de una respuesta inmune eficiente. En este sentido, recientemente se demostró que la polimerasa 3D del VFA es un determinante fuerte para células T, capaz de inducir respuestas T heterotípicas (Collen y col., 1998). Esta proteína altamente conservada en los distintos serotipos de VFA provee múltiples epitopes para células T para los diferentes serotipos y es una buena candidata para ser incluida en el diseño de vacunas peptídicas. Otra alternativa es la inclusión en las vacunas peptídicas de la región comprendida entre los aminoácidos 20 y 34 de VP4. Esta región ha sido identificada como un epitope fuertemente reconocido por células T, en el contexto de 4 haplotipos de CMH de bovinos de la raza Freisian-Holstein, que también se encuentran en otras razas de bovinos (Van Lierop y col., 1995).

Otra alternativa es aumentar la eficiencia de las vacunas peptídicas mediante la utilización de péptidos cíclicos. Una de las mayores desventajas de presentar epitopes para células B y T en la forma de péptidos lineales es que los mismos en solución existen en una gran variedad de conformaciones, de las cuales sólo una fracción es reconocida por anticuerpos específicos contra la proteína de la que forman parte. Esta puede ser la razón por la que se necesiten grandes excesos de péptidos sintéticos para despertar respuestas inmunes similares a las inducidas por el antígeno intacto. Cabe esperar que la utilización de péptidos sintéticos cíclicos restringidos a una conformación adecuada mejore la antigenicidad e inmunogenicidad del péptido. Camarero y colaboradores (1993), sintetizaron un péptido cíclico de la región 134 a 155 (sitio A) de la proteína VP1 del VFA C1, mediante un puente disulfuro interno que une los extremos del péptido. Sin embargo, no se observaron diferencias de reactividad entre el péptido cíclico y lineal frente a un panel de Mabs dirigidos contra el sitio antigénico A.

Otro problema importante en la utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos es su inestabilidad y su corta vida media debido a la rápida degradación proteolítica de los mismos *in vivo*. Esta desventaja podría salvarse mediante la utilización de péptidos retroinversos en los que se utilizan D-aminoácidos sintetizados en un orden invertido respecto de la secuencia original, que dejan la unión peptídica invertida pero las cadenas

laterales conservadas. Briand y colaboradores (1997) reportaron que la inoculación de dosis muy bajas de péptidos retroinversos representando los aminoácidos 141-159 del VFA de serotipo A indujo en cobayos una respuesta de anticuerpos neutralizantes más alta y de mayor duración en el tiempo que el correspondiente L-péptido y fue capaz de proteger cobayos frente al desafío con virus infeccioso. La alta estabilidad de los retro péptidos provee una estrategia interesante en el desarrollo de vacunas peptídicas. Además, es factible la utilización de péptidos retroinversos y cíclicos como estrategia combinada.

En el caso de patógenos altamente variables, una alternativa es la utilización de combinaciones de péptidos que representen un amplio repertorio de secuencias mutantes de él o los epitopes hipervariables representados en el péptido sintético. Este espectro de secuencias o mixotopos debería incluir las secuencias de los aislamientos naturales y de las mutantes más probables. El objetivo de la utilización de mixotopos es inducir una población de anticuerpos más amplia, capaz de reconocer una familia de epitopes relacionados. Sin embargo, al aumentar la complejidad de la mezcla de péptidos existe el riesgo de perder especificidad, ya que a medida que aumenta el número de secuencias diferentes la secuencia consenso se diluye. La utilización de mixotopos que representan la secuencia del *loop* V3 del HIV-1 mostró que los mismos fueron inmunogénicos en conejos y que tanto los mixotopos menos degenerados como los más degenerados (menor y mayor número de secuencias, respectivamente), fueron los que despertaron respuestas de anticuerpos menores (Gras-Masse y col., 1997).

Frente a las diferentes alternativas posibles para lograr una respuesta inmune eficiente utilizando vacunas a subunidades es necesario comprender previamente los diferentes factores que afectan la respuesta inmune en bovinos, tema al cual este trabajo de tesis representa una contribución.

VI. Conclusiones

- Es posible inducir en bovinos una respuesta inmune humoral y celular, así como protección frente al desafío viral, vacunando con péptidos sintéticos que incluyen epitopes para células B y T derivados del virus de la fiebre aftosa (VFA).
- La vacunación de bovinos con los péptidos sintéticos utilizados confirió bajos niveles de protección. Los mayores niveles de protección se obtuvieron con el péptido ACT y no superaron el 39%.
- No se observó un efecto dosis-respuesta en las concentraciones de péptido utilizadas. Una sola vacunación con péptidos sintéticos en las condiciones evaluadas en este trabajo induce títulos seroneutralizantes muy bajos, especialmente en los bovinos vacunados con péptido A. El efecto de la dosis inoculada pierde importancia cuando se aplica una dosis refuerzo o *booster*.
- La variación en los tiempos de inmunización y desafío afecta la respuesta inmune y protección conferidas por el péptido A, pero los péptidos más complejos analizados no se ven influidos por los diferentes esquemas de vacunación utilizados.
- No fue posible establecer una correlación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes ni la linfoproliferación con la protección. Sin embargo, de los parámetros inmunológicos analizados, la protección en ratón lactante fue la que mostró mejor correlación con protección en los bovinos inoculados con el péptido ACT.
- El péptido sintético A del serotipo C3 contiene epitopes para células T, ya que los linfocitos de bovinos vacunados con este péptido son capaces de proliferar frente al péptido sintético homólogo y frente a virus entero.
- Se observó una alta variabilidad en la respuesta inmune y protección de animales vacunados con una misma construcción peptídica. Esta variabilidad fue mayor cuando se utilizó el péptido A como inmunógeno y podría reflejar las restricciones impuestas por los genes del CMH clase II. Sin embargo, la tipificación de los alelos del gen DRB3 bovino no permitió relacionar la presencia diferencial de alelos con la protección o susceptibilidad frente al desafío viral.

- La utilización de un número limitado de epitopes como péptido libre en la vacunación contra un virus altamente variable y heterogéneo como el VFA, favoreció la selección de variantes de escape con sustituciones aminoacídicas únicas dentro del sitio antigénico A, suficientes para permitir que los virus variantes escapen a la respuesta inmune generada en el animal.
- Las variantes virales aisladas de los bovinos que no resultaron protegidos frente al desafío viral presentaron desventajas competitivas respecto del virus parental *in vitro*.
- La sustitución aminoacídica R(141)→G, que afecta al motivo RGD involucrado en el reconocimiento de la célula huésped, no impidió la entrada ni replicación del virus variante pero fue responsable de un retardo en las etapas tempranas de la infección en cultivos celulares. El RGD no es estrictamente imprescindible para la entrada del virus a la célula huésped.
- Las sustituciones aminoacídicas L(144)→P y L(147)→P modifican sustancialmente la antigenicidad de la partícula viral contrariamente a la sustitución aminoacídica R(141)→G.
- La presión inmune es responsable de la selección de variantes de escape en bovinos inmunizados con péptidos sintéticos.
- Otros sitios antigénicos además del sitio A contribuyen a la neutralización del virus del VFA.
- La selección de variantes virales es sólo un factor que contribuye a la falta de protección conferida por vacunas peptídicas.

La utilización de péptidos sintéticos como vacunas contra el VFA además de conferir un bajo nivel de protección, permite la selección de mutantes virales con sustituciones aminoacídicas críticas en los sitios antigénicos y representa más un riesgo que una solución en el control de esta enfermedad.



Dr. Eduardo L. Palma

M. Cecilia Tami

VII. Bibliografía

- ABRAMS, C. C., KING, A. M. Q. & BELSHAM, G. J. (1995). Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *Journal of General Virology* 76, 3089-3098.
- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D., FOX, G., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature (London)* 337, 709-716.
- ALONSO-FERNANDEZ, A., VIANNA FHILO, Y. L., DURINI, L. A. E. & SUTMOLLER, P. (1981). Foot-and-mouth disease viruses used in vaccine production and control in South America. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa* 43-44: 21-28.
- ANDERER, F. A. & SCHLUMBERGER, H. D. (1965). Properties of different artificial antigens immunologically related to tobacco mosaic virus. *Biochem. Biophys. Acta* 97, 503-509.
- ANDERSON, E. C., UNDERWOOD, B. O., BROWN, F. & NGICHABE, C. K. (1985). Variation in foot-and-mouth disease virus isolates in Kenya: an examination of field isolates by T1 oligonucleotide fingerprinting. *Veterinary Microbiology* 10, 409-423.
ANIMAL PHARM. No 405 September 25th, 1998, p16.
- ARNOLD, E., LUO, M., VRIED, G., ROSSMANN, M., PALMEMBERG, A., PARKS, G., NICKLIN, M. & WIMMER, E. (1987). Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 21-25.
- ARNON, R., MARON, E., SELA, M. & ANFINSEN, C. B. (1971). Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 1450-1455.
- AUGE DE MELLO, P. (1976). Plaque-reduction neutralization test for the assay of antibodies against foot-and-mouth disease. *Bull. Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, 21-21, 30-34.
- BACHRACH, H. L. (1968). Foot and Mouth disease virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 22, 201-244.
- BAHNEMAN, H. G. (1975). Binary ethilenimina as inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47, 47-56.
- BALTIMORE, D., GIRARD, M. & DARNELL, J. E. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* 29, 179.
- BARANOWSKY, E., SEVILLA, N., VERDAGUER, N., RUIZ-JARABO, C. M., BECK, E. & DOMINGO, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Journal of Virology* 72, 6362-6372.

BARTELING, S. J. & VREESWIJK, J. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 9, 75-88.

BAXT, B. & BECKER, Y. (1990). The effect of peptide containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes* 4, 73-83.

BAXT, B., VAKHARIA, V., MOORE, D. M., FRANKE, A. J. & MORGAN, D. O. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J Virology* 63, 2143-2151.

BEASLEY, K. M., FRANCIS, M. J., CLARKE, B. E., BEASLEY, J. E., DOPPING-HEPENSTAL, P. J. C., CLARE, J. J., BROWN, F. & ROMANOS, M. A. (1990). Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties. *Biotechnology* 8, 644-651.

BECK, E. & STROHMAIER, K., (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *Journal of Virology* 61, 1621-1629.

BELSHAM, G. J. & BRANGWYN, J. K. (1990). A region of the 5' non-coding region of foot and mouth disease virus RNA direct efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *Journal of Virology* 65, 5828-5838.

BELSHAM, G. J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO Journal* 11, 1105-1105.

BERINSTEIN, A., ROIVAINEN, M., HOVI, T., MASON, P. W. & BAXT, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) inhibits binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of Virology* 69, 2664-2666.

BITTLE, J. L., HOUGHTEN, R. A., ALEXANDER, H., SHINNICK, T. M., SUTLIFF, J. G., LERNER, R. A., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with chemically synthesized peptide predicted from the nucleotide sequence. *Nature (London)* 298, 30-33.

BJORKMAN, P. J., SAPER, M. A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W. S., STROMINGER, J. L. & WILEY, D. C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.

BJORKMAN, P. J., SAPER, M. A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W. S., STROMINGER, J. L. & WILEY, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-516.

BOLWELL, C., BROWN, A. L., BARNETT, P. V., CAMPBELL, R. O., CLARKE, B. E., PARRY, N. R., OULDRIDGE, E. J., BROWN, F. & ROWLANDS, D. J. (1989). Host cell

selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology* 62, 2050-2058.

BOLWELL, C., CLARKE, B. E., PARRY, N. R., OULDRIDGE, E. J., BROWN, F. & ROWLANDS, D. J. (1989). Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *Journal of General Virology* 70, 59-68.

BOOTHROYD, J. C., HARRIS, T., ROWLANDS, D. & LOWE, P. (1989). The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene* 17, 153-161.

BOOTHROYD, J. C., HIGHFIELD, P., ROWLANDS, D., LOWE, P., BROWN, F. & HARRIS, T. (1989). Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequence in the structural protein genes. *Nature* 290, 800-805.

BORREGO, B., NOVELLA, I. S., GIRALT, E., ANDREU, D. & DOMINGO, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *Journal of Virology* 67, 6071-6079.

BRIAND, J. P., BENKIRANE, N., GUICHARD, G., NEWMAN, J. F. E., VAN REGNEMORTEN, M. H. V., BROWN, F. & MULLER, S. (1997). A retro-inverso peptide corresponding to the GH loop of foot-and-mouth disease virus elicits high levels of long-lasting protective neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 12545-12550.

BROEKHUIJSEN, M. P., BLOM, T., KOTTENHAGEN, M., POUWELS, P. H., MELOEN, R. H., BARTELING, S. J. & ENGEL-VALK, B. E. (1986). Synthesis of fusion proteins containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 4, 119-123.

BROEKHUIJSEN, M. P., VAN RIJN, J. M. M., BLOM, A. J. M., POUWELS, P. H., ENGEL-VALK, B. E., BROWN, F. & FRANCIS, M. J. (1987). Fusion proteins with multiples copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *Journal of General Virology* 69, 3137-3140.

BROOKSBY, J. B. & ROGERS, J. (1957). In *Methods of typing and cultivating of foot and mouth disease viruses*, OEEC, Paris.

BROOKSBY, J. B. (1958). The virus of foot and mouth disease. *Adv. Virus Research* 5, 1-37.

BROWN, F., CARTWRIGHT, B. & STEWARD, D. L. (1962). Further studies on the infection of pig kidney cells by foot and mouth disease virus. *Biochem. Biophys. Acta* 55, 768-774.

BURROUGHS, J., ROWLANDS, D., SANGAR, D., TALBOT, P. & BROWN, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in foot and mouth disease virus particles. *Journal of General Virology* 13, 73-78.

BURROWS, R. (1968). Excretion of foot-and-mouth disease prior to the development of lesions. *Vet. Rec.* 82, 387-388.

CAMARERO, J. A., ANDREU, D., CAIRO, J. J., MATEU, M. G., DOMINGO, E. & GIRALT, E. (1993) Cyclic disulfide model of the major antigenic site of serotype-C foot-and-mouth disease virus. *FEBS* 328, 159-164.

CAPOZZO, A. V. E., PERIOLO, O. H., ROBILOLO, B., SEKI, C., LA TORRE, J. L. & GRIGERA, P. R. (1997). Total isotype humoral response in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine* 15, 624-630.

CARREÑO, C., ROIG, X., CAIRO, J., CAMARERO, J., MATEU, M. G., DOMINGO, E., GIRALT, E. & ANDREU, D. (1992). Studies on antigenic variability of C strains of foot-and-mouth disease virus by means of synthetic peptides and monoclonal antibodies. *Int. J. Protein Res.* 39, 41-47.

CARRILLO, E. (1985). Replicación del virus de la fiebre aftosa. Estudio del mecanismo de penetración. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

CARRILLO, E. C., RIEDER ROJAS, E., CAVALLARO, L., SCHIAPPACASSI, M. & CAMPOS, R. (1989). Modification of Foot-and-Mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology* 171, 599-601.

CARRILLO, E., GIACHETTI, C. & CAMPOS, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the natural foot-and-mouth disease virus replication. *Virology* 135, 542-545.

CARROLL, A. R., ROWLANDS, D. J. & CLARKE, B. E. (1984). The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research* 12, 2461-2472.

CARUTHERS, M. H. (1982). Chemical synthesis of oligonucleotides using the phosphite triester intermediates. In H. G. Gasser and A. Lang (ed), *Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments: a laboratory manual*. Verlag-Chemie, Weinheim, Federal Republic of Germany. p. 71-79.

CAVANAGH, D., ROWLAND, D. & BROWN, F. (1978). Early events in the interaction between foot-and-mouth disease virus and primary kidney cells. *Journal of General Virology* 41, 255-264.

CHARTAJEE, N. K., BACHRACH, H. L. & POLATNIK, J. (1976). Foot-and-mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal polyribadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology* 69, 369-377.

- CHEUNG, A., DELAMARTER, J., WEISS, S. & KÜPPER, H. (1983). Comparison of the major determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* 48, 451-459.
- CHINSANGARAM, J., MASON, P. W. & GRUBMAN, M. J. (1998). Protection of swine by live and inactivated prepared from leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 16, 1516-1522.
- CHOW, M., NEWMAN, J. F. E., FILMAN, D., HOGLE, J. M., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327, 482-486.
- CLARKE, B. E., NEWTON, S. E., CARROLL, A. R., FRANCIS, M. J., APPELYARD, G., SYRED, A. D., HIGHFIELD, P. E., ROWLAND, D. J. & BROWN, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* 330, 381-386.
- COLLEN, T., BARON, J., CHILDERSTONE, A., CORTEYN, A., DOEL, T. R., FLINT, M., GARCIA-VALCARCEL, M., PARKHOUSE, R. M. E. & RYAN, M. D. (1998). Heterotypic recognition of recombinant FMDV proteins by bovine T-cells: the polymerase (P3D^{pol}) as an immunodominant T-cell immunogen. *Virus Research* 56, 125-133.
- COLLEN, T. & DOEL, T. R. (1990). Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 71, 309-315.
- COLLEN, T. (1994) Foot-and-mouth disease (aphthovirus): viral T cell epitopes. In B. M. L. Goddevis and Morrison, I (ed), *Cell mediated immunity in ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. p.173-197.
- COLLEN, T., DIMARCHI, R. & DOEL, T. (1991). T cell epitope in vp1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J. Immunology* 146, 749-755.
- COLLEN, T., PULLEN, L. & DOEL, T. R. (1989). T cell dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *Journal of General Virology* 70, 395-403.
- COLONNO, R. J., CANDRA, J. H., MIZUTANI, S., CALLAHAN, P. L., DAVIES, M. & MURKO, M. A. (1988). Evidence for the direct involvement of rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 5449-5453.
- COTTRAL, G. (1975). Foot and mouth disease virus. In: *Foreign Animal Disease, Third ed.*, Committee on Foreign Animal Diseases, United States Animal Health Association, Richmond, VA.
- COTTRAL, G. E., COX, B. F. & BALDWIN, D. E. (1960). The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. *American Journal of Veterinary Research* 21, 288-297.

COTTRAL, G.E., GAILIUNAS, P. & COX, B. F. (1968). Foot-and-mouth disease virus in the semen of bulls and its transmission by artificial insemination. Arch. Fur die Gesamte Virusforschung 23, 362-377.

COX, J. H., IVANYI, J., YOUNG, D. B., LAMB, J. R., SYRED, A. D. & FRANCIS, M. J. (1988). Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. Eur. Journal of Immunology 18, 2015-2019.

CRAWFORD, N. M. & BALTIMORE, D. (1983). Genome linked protein Vpg of poliovirus is present as free Vpg and Vpg-PUPU in poliovirus infected cells. Proc. Natl. Sci. USA. 80, 7452-7455.

CROWELL, R. & LANDAU, B. J. (1979). Receptors as determinants of cellular tropism in picornavirus infection. In receptors and human disease. Bean, A. G., Chopin, P. (es). Jos. Macy Fdn. N. Y. pp 1-33.

CROWTHER, J. R., FARIAS, S., CARPENTER, W. C. & SAMUEL, A. (1993). Identification of a fifth neutralizable site of type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. Journal of General Virology 74, 1547-1553.

DE BORDE, D. C., NAEVE, C. W., HERLOCHER, M. L. & MAASSAB, H. F. (1986). Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferasa. Ana. Biochem. 157, 275-282.

DE LA TORRE, J. C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J. & DOMINGO, E. (1985). Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. Virology 145, 24-35.

DEVANNEY, M. A., VAKHAIRA, V. N., LLOYD, R. E. EHRENFELD, E. & GRUBMAN, M. J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease protein is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. Journal of Virology 62, 4407-4409.

DIEZ, J., DAVILA, M., ESCARMIS, C., MATEU, M. G., DOMINGUEZ, J., PEREZ, J. J., GIRALT, E., MELERO, J. A. & DOMINGO, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. Journal of Virology 64, 5519-5528.

DIEZ, J., MATEU, M. G. & DOMINGO, E. (1989). Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease in the absence of antibodies, as revealed by an *in situ* assay. Journal of General Virology 64, 5519-5528.

DIMARCHI, R., BROOKE, G., GALE, C., CRACKNELL, V., DOEL, T. & MOWAT, N. (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. Science 232, 639-641.

- DOEL, T. R. & CHONG, W. K. T. (1982). Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of FMDV. *Arch. Virol.* 73, 185-191.
- DOEL, T. R., DOEL, C. M. F. A., STAPLE, R. F. & DIMARCHI, R. (1992). Cross-reactive and serotype-specific antibodies against foot-and-mouth disease virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *Journal of Virology* 66, 2187-2194.
- DOEL, T. R., GALE, C., BROOKE, G. & DIMARCHI, R. (1988). Immunization against foot-and-mouth disease with sythetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *Journal of General Virology* 69, 2403-2406.
- DOEL, T. R., GALE, C., DO AMARAL, C. M. C. F., MULCAHY, G. & DIMARCHI, R. (1990). Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* 64, 2260-2264.
- DOMINGO, E. & HOLLAND, J. J. (1988). High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication system, p. 3036. In E. Domingo, J. J. Holland & P. Ahlquist (ed.), *RNA genetics*, vol. 3. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- DOMINGO, E. & HOLLAND, J. J. (1988). Variability of RNA genomes. In: Domingo, E., Holland, J. J. & Ahlquist, P., eds. *RNA genetics*, vol. 3. pp. 3-36, Boca Raton: CRC Press.
- DOMINGO, E. & HOLLAND, J. J. (1994). Mutations rates and rapid evolution of RNA virus, p 161-183. In S. S. Morse (ed), *The evolutionary biology of viruses*. Raven Press Ltd., New York, N.Y.
- DOMINGO, E., DAVILA, M. & ORTIN, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from natural populations of foot and mouth disease virus. *Gene* 11, 333-346.
- DOMINGO, E., DIEZ, J., MARTINEZ, M. A. HERNANDEZ, J, HOLGUIN, A., BORREGO, B. & MATEU, G. M. (1993). New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variations is not dependent on immune selection. *Journal of General Virology* 74, 2039-2045.
- DOMINGO, E., ESCARMIS, C., MARTINEZ, M. A., MARTINEZ-SALAS, E. & MATEU, M. G. (1992). Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Current topics in Microbiology and Immunology* 176, 33-47.
- DOMINGO, E., SABO, D., TANIGUCHI, T. & WEISSMANN, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13, 735-744.
- DOPAZO, J., SOBRINO, F., PALMA, E. L., DOMINGO, E. & MOYA, A. (1988). Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6811-6815.
- DULBECCO, R. & FREEMAN, G. (1959). Plaque reduction by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-401.

- EAGLE, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
- EIGEN, M. & BIEBRICHER, C. K. (1988). Sequence space in quasispecies distribution. In: Domingo, E., Holland, J. J. & Ahlquist, P., eds. *RNA genetics*, vol. 2. pp. 211-245, Boca Raton: CRC Press.
- EIGEN, M. & SCHUSTER, P. (1979). *The hypercycle: a principle of natural self-organization*. Berlin: Springer-Verlag.
- ESCARMIS, C., CARRILLO, E. C., FERRE, M., GARCIA ARRIAZA, J. F., LOPEZ, N., TAMI, M. C., VERDAGUER, N. DOMINGO, E. & FRANZE-FERNANDEZ, M. T. (1998). Rapid selection in modified BHK-21 cells of foot-and-mouth disease virus variants showing alterations in cell tropism. *Journal of Virology* 77, 10171-10179.
- ESCARMIS, C., TOJA, M., MEDINA, M. & DOMINGO, E. (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Research* 26, 113-125.
- FAGG, R. & HYSLOP, N. S. G. (1966). Isolation of a variant strain of foot and mouth disease virus (type O) during passages in partly immunized cattle. *Hyg.* 64, 397-404.
- FALK, M. M., GRIGERA, P. R. SAIZ, J. C. & SOBRINO, F. (1993). Foot and mouth disease virus proteasa 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *Journal of Virology* 64, 748-756.
- FEIGELSTOCK, D. A. (1995). *Epidemiología molecular del virus de la fiebre aftosa serotipo C*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- FEIGELSTOCK, D. A., MATEU, M. G., VALERO, M. L., ANDREU, D., DOMINGO, E. & PALMA, E. L. (1996). Emerging foot-and-mouth disease virus variants with antigenically critical amino acid substitutions predicted by model studies using reference viruses. *Vaccine* 14, 97-102.
- FEIGELSTOCK, D., MATEU, M. G., PICCONE, M. E., BROCCHI, E., DOMINGO, E. & PALMA E. L. (1992). Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *Journal of General Virology* 73, 3307-3311.
- FERNANDEZ TOMAS, C. & BALTIMORE, D. (1973). Morphogenesis of picornavirus. Demonstration of a new intermediate, the provirion. *Journal of Virology* 12, 1122.
- FORMAN, A. J. & GIBBS, E. P. J. (1974). Studies with foot-and-mouth disease virus in british deer (red, fallow and roe). I. Clinical disease. *Journal of Comparative Pathology* 84, 215-220.

- FORSS, S., STREBEL, K., BECK, E. & SCHALLER, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 12, 6587-6601.
- FOX, G., PARRY, N., BARNETT, P. V., MCGINN, B., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *Journal of General Virology* 70, 625-637.
- FOX, G., STUART, D., ACHARYA, R. K., FRY, E., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1987). Crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J Mol Biol* 196, 591-597.
- FRANCIS, M. J. & CLARKE, B. E. (1989). Peptide vaccines based on enhanced immunogenicity of peptide epitopes presented with T-cell determinants or hepatitis B core protein. *Methods in Enzymology* 178, 659-673.
- FRANCIS, M. J., FRY, C. M., ROWLAND, D. J. & BROWN, F. (1988). Qualitative and quantitative differences in the immune response to foot-and-mouth disease virus antigens and synthetic peptides. *Journal of General Virology* 68, 2483-2491.
- FRANCIS, M. J., FRY, C. M., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1985). Priming with peptides of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 85, 203-210.
- FRANCIS, M. J., FRY, C. M., ROWLANDS, D. J., BITTLE, J. L., HOUGHTEN, R. A., LERNER, R. A. & BROWN, F. (1987). Immune response to uncoupled peptide of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, 61, 1-6.
- FRANCIS, M. J., HASTINGS, G. Z., SYRED, A. D., MCGINN, B. BROWN, F. & ROWLANDS, D. J. (1988). Peptides with added T-cell epitopes can overcome genetic restriction of the immune response. *Vaccine* 88, 1-7.
- FRANCIS, M. J., HASTINGS, G. Z., SYRED, A. D., MCGINN, B., BROWN, F. & ROWLANDS, D. J. (1987). Non-responsiveness to foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreign helper T-cell determinants. *Nature* 330, 168-170.
- FRANCIS, M. J., OULDRIDGE, E. J. & BLACK, L. (1983). Antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot-and-mouth disease vaccination and, or, exposure to live virus. *Res. Vet. Sci.* 35, 206-210.
- FRASCATORIUS, H. (1546). *De contagione et contagiosis morbis et curatione*. Book I, Chapter 12, Venezia.
- FRENKEL, S. H. (1951). Research on foot-and-mouth disease II. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *American Journal of Veterinary Research* 12, 187-199.
- FREUND, J. & THOMPSON, K. (1945). A simple rapid technique of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologicals. *Science* 101, 468-471.

FRY, M. & LOEB, L. A. (1986). Fidelity of DNA synthesis. In: Fry, M. & Loeb, L. A. eds. *Animal cell DNA polymerases*. Boca Ratón: CRC Press, 157-183.

GARCIA-VALCARCEL, M., DOEL, T. R., COLLEN, T. RYAN, M. & PARKHOUSE, M. E. (1998). Recognition of foot-and-mouth disease virus and its capsid protein VP1 by bovine peripheral T lymphocytes. *Journal of General Virology* 77, 727-735.

GEBAUER, F., DE LA TORRE, J. C., GOMES, I., MATEU, M. G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P. & DOMINGO, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *Journal of Virology* 62, 2041-2049.

GIAVEDONI, L. D., KAPLAN, G., MARCOVECCHIO, F., PICCONE, M. E. & PALMA, E. L. (1991). Protection conferred by TRpE fusion proteins containing portions of the C terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology* 72, 967-971.

GLASS, E. J., OLIVER, R. A., COLLEN, T. DOEL, T. R., DIMARCHI, R. & SPOONER R. L. (1991). MHC class II restricted recognition of FMDV peptides by bovine T cells. *Immunology* 74, 594-599.

GRAS-MASSE, H., BOUTILLON, C., DIESIS, E., DEPREZ, B. & TARTAR, A. (1997). Confronting the degeneracy of convergent combinatorial immunogens, or "mixotopes", with the specificity of recognition of the target sequences. *Vaccine* 15, 1568-1578.

GRIGERA, P. R., GARCÍA-BRIONES, M., PERIOLO, O., LA TORRE, J. L. & WAGNER, R. R. (1996). Immunogenicity of an aphthovirus chimera of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology* 70, 8492-8501.

GRUBMAN, M. J. (1980). The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch Virol* 63, 311-315.

GRUBMAN, M. J. & BAXT, B. (1982). Translation of foot and mouth disease virion RNA and processing of the primary cleavage product in a rabbit reticulocyte lysate. *Virology* 116, 19-30.

GRUBMAN, M. J., LEWIS, S. A. & MORGAN, D. O. (1993). Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* 11, 825-829.

GRUBMAN, M. J., MORGAN, D. O., KENDALL, J. & BAXT, B. (1985). Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA programmed cell free translation system and in infected cells. *Journal of Virology* 56, 120-126.

HABEL, K. (1969). Virus neutralization test. In: *Fundamental techniques in Virology* (Habel, K. And Salzman, N. P. eds.). Academic Press New York. 288-296.

HOGLE, J. M., CHOW, M. & FILMAN, D. J. (1985). The three-dimensional structure of poliovirus at 2,9 Å resolution. *Science* 229, 1358-1365.

HOLGUIN, A., HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M. A., MATEU, M. G. & DOMINGO, E. (1997). Differential restrictions on antigenic variation among antigenic sites of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibody selection. *Journal of General Virology* 78, 601-609.

HOLLAND, J. J., DOMINGO, E., DE LA TORRE, J. C. & STEINHAUSER, D. A. (1992). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *Journal of Virology* 64, 3960-3962.

HRUBY, D. & ROBERTS, W. K. (1976). Variations in polyadenilic acid content and biological activity. *Journal of Virology* 19, 325-330.

HYSLOP, N. S. G. (1965). Isolation of variant strains of foot-and-mouth disease virus propagated in cell culture containing antiviral sera. *J. Gen. Microbiol.* 41, 135-142.

JACKSON, T., ELLARD, F., ABU-GHAZALEH, R., BROOKES, S. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology* 70, 5282-5287.

KAPLAN, G. (1986). Variabilidad genómica de la cepa C3 Resende del virus de la fiebre aftosa por pasajes seriados en distintos sistemas celulares. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

KING, A. (1988). Genetic recombination in positive strand RNA viruses. In: Domingo, E., Holland, J. J. & Ahlquist, P., eds. *RNA genetics*, vol. 2. Pp. 149-165. Boca Raton: CRC Press.

KING, A., MC CAHON, D., SAUNDERS, K., NEWMAN, J. W. I. & SLADE, W. (1985). Multiple sites of recombination within RNA genome of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* 3, 373-384.

KING, A., MC CAHON, D., SLADE, W. & NEWMAN, J. W. I. (1982). Recombination in ARN. *Cell* 29, 921-928.

KIT, S., KIT, M., DIMARCHI, R., LITTLE, S. P. & GALE, C. (1991). Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch Virol* 120, 1-17.

KITCHING, R. P. (1998). A recent history of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.* 118, 89-108.

KITSON, J. D. A., MCCAHERN, D. & BELSHAM, G. J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence

for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* 179, 26-33.

KLEID, D. G., YANSURA, D., SMALL, B., DOWBENKO, D., MOORE, D. M., GRUBMAN, M. J., MCKERCHER, P. D., MORGAN, D. O., ROBERTSON, B. H. & BACHRACH, H. L. (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* 214, 1125-1129.

KLUMP, W., MARQUARVT, O. & HOFSCHEIDER, P. H. (1984). Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3351-3355.

KUHN, R., LUZ, N. & BECK, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot and mouth disease virus. *Journal of Virology* 64, 4625-4631.

KUPPER, H., KELLER, W., KURZ, C. FROSS, S., SCHALLER, H., FRANZE, R., STROHMAIER, K., MARQUARDT, O., ZASLAVSKY, V. G. & HOFSCHEIDER, P. H. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. Coli*. *Nature*, 289, 555-559.

LANGEVELD, J. P. M., CASAL, J. I. & OSTERHAUS, A. D. M. (1994). First peptide vaccine providing protection against viral infection in target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *Journal of Virology* 68, 4506-4513.

LANGEVELD, J. P. M., MELOEN, R. H., DALSGAARD, K. & CASAL, J. L. (1995). Success with a peptide vaccine in the target animal: firm protection against viral host range variants. *Vaccine* 13, 1033-1037.

LEA, S., HERNANDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZALEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D. & MATEU, M. G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, 2, N°2, 123-139.

LEIPPERT, M., BECK, E., WEILAND, F. & PFAFF, E. (1997). Point mutations within the β G- β H loop of foot-and-mouth disease virus O1K affect virus attachment to target cells. *Journal of Virology* 71, 1046-1051.

LERNER, R. A., GREEN, N., ALEXANDER, H., LIU, F. T., SUTCLIFFE, J. G. & SHINNICK, T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dan particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 3403-3407.

LEWIS, S. A., MORGAN, D. O. & GRUBMAN, M. J. (1991). Expression, processing and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: Induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *Journal of Virology* 65, 6572-6580.

- LOEB, L. A. & KUNKEL, T. A. (1982). Fidelity of DNA syntesis. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 429-457.
- LOGAN, D., ABU-GHAZALEH, R., BLAKEMORE, W., CURRY, S., JACKSON, T., KING, A., LEA, S., LEWIS, R., NEWMAN, J., PARRY, N., ROWLANDS, D., STUART, D. & FRY, E. (1993). Structure of a major imunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature* 362, 566-568.
- LUCAS-LENARD, J. M. (1979). "The molecular biology of picornaviruses". p. 73. Perez-Bercoff, Cambridge University Press, New York.
- MARTIN, R. (1987). Overcoming DNA sequencing artifacts: stop and compressions. *Focus* 9 (1), 8-10.
- MARTINEZ, M. A., HERNANDEZ, J., PICCONE, M. E., PALMA, E. L., DOMINGO, E., KNOWLES, N. & MATEU, M. G. (1991). Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 184, 695-706.
- MARTINEZ, M. A., VERDAGUER, N. MATEU, M. G. & DOMINGO, ESTEBAN (1997). Evolution subverting essentiality: Dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiplypassaged foot-and-mouth disease virus. *Porc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6798-6802.
- MARTINEZ-SALAS, E., SAIZ, J. C., DAVILA, M., BELSHAM, G. G. & DOMINGO, E. (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot and mouth disease virus leads to enhanced cap independent translation in vivo. *Journal of Virology* 67, 3748-3755.
- MASON, P. W., PICCONE, M. E., MCKENNA, T. S. C., CHINSANGARAM, J. & GRUBMAN, M. J. (1997). Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* 227, 96-102.
- MASON, P. W., RIEDER, E. & BAXT, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be by passed by antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Scie* 91, 1932-1936.
- MATEU, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Research* 38, 1-24.
- MATEU, M. G., DA SILVA, J. L., ROCHA, E., DE BRUM, D. L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E. & BARAHONA, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* 167, 113-124.
- MATEU, M. G., HERNANDEZ, M. A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PEREZ, J. J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E. L. & DOMINGO, E. (1994). Antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *Journal of virology* 68, 1407-1417.

MATEU, M. G., MARTINEZ, M. A., ROCHA, E., ANDREU, D., PAREJO, J., GIRALT, E., SOBRINO, F. & DOMINGO, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5883-5887.

MATEU, M. G., ROCHA, E., VICENTE, O., VAYREDA, F., NAVALPOTRO, C., ANDREU, D., PEDROSO, E., GIRALT, E., ENJUANTES, L. & DOMINGO, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* 8, 261-274.

MATEU, M.G., MARTINEZ, M. A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCHI, E. & DOMINGO, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Journal of Virology* 71, 629-637.

MATEU, M. G., ANDREU, D. & DOMINGO, E. (1995). Antibodies raised in natural host and monoclonal antibodies recognize antigenic features of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 210, 120-127.

MATEU, M. G., ANDREU, D., CARREÑO, C., ROIG, X., CAIRO, J. J., CAMARERO, J. A., GIRALT, E. & DOMINGO, E. (1992). Non-additive effects of multiple amino acid substitutions on antigen-antibody recognition. *Eur. J. Immunol.* 22, 1385-1389.

MEYER, R. F. & BROWN, F. (1995). Sequence identification of antigenic variants in plaque isolates of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods* 00, 1-3.

MBAYED, V. SCHIAPPACASSI, M, COROMINAS, A. & CAMPOS R. (1997). Characteristic in vitro evolution pattern of foot-and-mouth disease virus A81/Castellanos / Arg/87. *Virus Research* 48, 157-163.

Mc CAULEY, E., AULAQUI, N., SUNDQUIST, W., NEW, J. & MILLER, W. (1997). A study of the potential economic impact of foot and mouth disease in the US. *Proc. Of United States Animal Health Assoc.*, 81 st. Annual Meeting, p284.

MC CULLOUGH, K. C., CROWTHER, J. R., BUTCHER, R. N., CARPENTER, W. C., BROCCHI, E., CAPUCCI, L. & DE SIMONE, F. (1986). Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus neutralizing and nonneutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology* 58, 421-428.

MC CULLOUGH, K. C., PARKINSON, D. & CROWTHER, J. R. (1988). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 65, 187-191.

MC KENNA, T. S. C., LUBROTH, J., RIEDER, E., BAXT, B. & MASON, P. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *Journal of Virology* 69, 5787-5790.

MCGUIRE, T. C., MUSOKE, A. J. & KURTTI, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages and skin. *Immunology* 38, 249-255.

MEDINA, M., DOMINGO, E., BRANGWIN, J. K. & BELSHAM, G. J. (1993). The two species of the foot and mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* 194, 355-359.

MELOEN, R. H. & BARTELING, S. J. (1986). An epitope located at the C-terminus of isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus O induces neutralizing activity but poor protection. *Journal of General Virology* 67, 289-294.

MELOEN, R. H., PUYK, W. C., LANKHOF, H., VAN BEKKUM, J. G., THOMAS, A. & SCHAAPER, W. M. M. (1989). Specificity at the level of single amino acids of anti-whole foot-and-mouth disease virus subpopulations present in polyclonal anti-peptide sera. *Synthetic Peptides: Approach to Biological Problems*, 171-180. Alan R. Liss. Inc.

MERRIFIELD, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 5833-5887.

MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 16, 1215.

MORGAN, D. O & MOORE, D. M. (1990). Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *American Journal of Veterinary Research* 51, 40-45.

MOWAT, G. H. (1961). Multiplication "in vivo" of modified foot-and-mouth disease virus. *Res. Vet. Sci* 2, 153-155.

MOWAT, G. H. (1964). Selection of attenuated strains of foot-and-mouth disease virus by cloning in tissue culture. *Bull. Off. Int. Epiz.* 61, 639-642.

MOWAT, G. N. & CHAPMAN, W. G. (1962). Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidney. *Nature* 194, 253-255.

MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYSIAN, S. & DIMARCHI, R. D. (1990). Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 8, 249-257.

MULCAHY, G., PULLEN, L. A., GALE, C., DIMARCHI, R. D. & DOEL, T. R. (1991). Mouse protection test as a predictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 9, 19-24.

MÜLLER, G. M., SHAPIRA, M. & ARNON, R. (1982). Antiinfluenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 569-573.

- NEWMAN, J. F., PIATTI, P. G., GORMAN, B. M., BURRAGE, T. G., RYAN, M. D., FLINT, M. & BROWN, F. (1994). Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc. Natl. Sci. USA.* 91, 733-737.
- NOMOTO, A., LEE, Y. F. & WIMMER, E. (1976). The 5' end of poliovirus RNA is not capped with m7G(5')pppNp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 375.
- NOVELLA, I. S., BORREGO, B., MATEU, M. G., DOMINGO, E., GIRALT, E. & ANDREU, D. (1993). Use of tandem-repeated peptides to probe the relevance of the highly conserved RGD tripeptide in the immune response against foot-and-mouth disease virus. *FEBS* 3, 253-259.
- PARRY, N. R., OULDRIDGE, E. J., BARNETT, P. V., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1989). Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus II. Mapping the three conformational sites with synthetic peptide reagents. *Journal of General Virology* 70, 1493-1499.
- PARTIDOS, C. D., STANLEY, C. M. & STEWARD, M. W. (1992). The effect of orientation of epitopes on the immunogenicity of chimeric synthetic peptides representing measles virus protein sequences. *Molecular Immunology* 29, 651-658
- PAY, T. W. F. & HINGLEY, P. J. (1987). Correlation of 140 S antigen dose with the serum neutralising antibody response and the level of protection induced in cattle by foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 5, 60-67.
- PEREIRA, H. G. (1977). Subtyping of foot and mouth disease virus. In: *Developments in Biological Standardization*. (C. MacKowiat and R. H. Regamey, eds), Vol. 35. Karger, Basel, pp. 167-174.
- PEREIRA, H. G. (1981). Foot-and-mouth disease. In "Virus Diseases of Food Animals" (E. P. J. Gibbs, ed.), vol. 2, pp 333-363. Academic Press, New York.
- PEREZ FILGUEIRAS, D. M., BERISTEIN, A., SMITSAART, E., BORCA, M. V. & SADIR, A. M. (1995). Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot-and-mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulation. *Vaccine* 13, 953-960.
- PFAFF, E., MUSSGAY, M., BOHM, H. O., SCHULZ, E. G. & SCHALLER, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. *Embo Journal* 1, 869-874.
- PIATTI, P., BERISTEIN, A., LOPEZ, O., BORCA, M., FERNANDEZ, F., SCHUDEL, A. & SADIR, A. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *Journal of General Virology* 72, 1691-1694.

- PIATTI, P., HASSARD, S., NEWMAN, J. F. E. & BROWN, F. (1995). Antigenic variants in a plaque-isolate of foot-and-mouth disease virus: implications for vaccine production. *Vaccine* 13, 781-784.
- PICCONE, M. E., KAPLAN, G., GIAVEDONI, L., DOMINGO, E. & PALMA, E. L. (1988). VP1 of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *Journal of Virology* 62, 1469-1473.
- PICCONE, M. E., RIEDER, E., MASON, P. W., & GRUBMAN, M. J. (1995). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *Journal of Virology* 70, 5638-5641.
- PINTO, A. & GARLAND, A. J. M. (1979). Immune response to virus infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth inactivated by formalin or acetyleneimine. *Journal of Hyg.* 82, 41-50.
- PORTER, A. G. (1993). Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *Journal of Virology* 67, 6917-6921.
- PORTER, A. G., FELLNER, P., BLACK, D., ROWLANDS, D., HARRIS, T. J. & BROWN, F. (1978). 3' Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature* 276, 298-301.
- RADLETT, P. J., PAY, T. W. F. & GARLAND, A. J. M. (1985). The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot-and-mouth disease vaccines over a twenty year period. *Dev Biol Stand* 60, 163-170.
- REED, L. & MUENCH, H. (1938). A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- RIEDER, E., BUNCH, T., BROWN, F. & MASON, P. W. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly (C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *Journal of Virology* 67, 5139-5145.
- RIVENSON, S., SADIR, A., GAGGINO, O. P., MARCOVECHIO, F. E., ZABAL, O. & LAPORTE, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidroxisaponinada. *Rev. Med. (Buenos Aires)* 63, 364-370.
- ROBERTSON, B. H., GRUBMAN, M. J., WEDDELL, G. N., MOORE, D. M., WELSH, J. D., FISCHER, T., DOWBENKO, D., YANSURA, D., SMALL, B. & KLEID, D. G. (1985). Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J Virol* 54, 651-660.
- ROBERTSON, B. H., MORGAN, D. O., MOORE, D. M., GRUBMAN, M. J., CARD, J., FISCHER, T., WEDDELL, G. DOWBENKO, D. & YANSURA, D. (1983) Identification of amino acid and nucleotide sequence of the foot and mouth disease virus RNA polymerase. *Virology* 126, 614-623.

- RODRIGUEZ, A. N. & ESTRADA, T. S. (1966). Guía de cultivos celulares. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, serie de manuales técnicos N° 1, 30-38.
- RODRIGUEZ, A., SAIZ, J. C., NOVELLA, I. S., ANDREU, D. & SOBRINO, F. (1994). Antigenic specificity of porcine T cell response against foot-and-mouth disease virus: identification of T helper epitopes in VP1. *Virology* 205, 24-33.
- ROOSIEN, J., BELSHAM, G. J., RYAN, M. D., KING, M. Q. & VLAK, J. M. (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression system. *Journal of General Virology* 71, 1703-1711.
- ROWLANDS, D. J., HARRIS, T. J. R. & BROWN, F. (1978). More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA. *Journal of Virology* 26, 335-343.
- ROWLANDS, D. J., SANGAR, D. V. & BROWN, F. (1975). A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* 64, 4099-4107.
- ROWLAND, D. J., CLARKE, B. E., CARROLL, A. R., BROWN, F., NICHOLSON, B. H., BITTLE, J. L., HOUGHTEN, R. A. & LERNER, R. A. (1983). Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* 306, 694-697.
- RUECKERT, R. (1976). On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In: *Comprehensive Virology* Vol. I pp 131. Edited by H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, N. Y., Plenum press.
- RUECKERT, R. (1985). Picornaviruses and their replication. In: *Virology* Ed. B. Fields p 705 Raven press, N. Y.
- RUIZ-JARABO, C. M., SEVILLA, N., DAVILA, M., GOMEZ-MARIANO, G., BARANOWSKI, E. & DOMINGO, E. (1999). Antigenic properties and population stability of a foot-and-mouth disease virus with altered Arg-Gly-Asp receptor-recognition motif. *Journal of General Virology* 80, 1899-1909.
- RWEYEMAMU, M. M., TERRY, G. & PAY, T. W. F. (1979). Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 59, 69-79.
- RYAN, M. D., BELSHAM, D. N. & KING, A. M. (1989). Specificity of enzyme substrate interactions in FMDV polyprotein processing. *Virology* 173, 35-45.
- SAIZ, J. C., GONZALES, M. J., MORGAN, D. O., CARD, J. L., SOBRINO, F. & MOORE, d. M. (1989). Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes on FMDV A5 subtypes. *Virus Research* 13, 45-60.

- SAIZ, J. C., GONZALEZ, M. J., BORCA, M. V., SOBRINO, F. & MOORE, D. M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *Journal of Virology* 65, 2518-2525.
- SANGAR, D. V., ROWLANDS, D. T., HARRIS, T. J. R & BROWN, F. (1977). A protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA. *Nature (London)* 268, 648-650.
- SANGAR, D. V. (1979). The replication of picornaviruses. *Journal of General Virology* 45, 1-13.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 5463-5467.
- SANZ-PARRA, A., BLASCO, R., SOBRINO, F. & LEY, V. (1998). Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with a recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins. *Arch. Virol.* 143, 389-398.
- SCHIAPPACASSI, M., RIEDER ROJAS, E., CARRILLO, C. & CAMPOS, R. (1995). Response of foot-and-mouth disease virus C3 Resende to immunological pressure exerted in vitro by antiviral polyclonal sera. *Virus Research* 36, 77-85.
- SCHUDEL, A. A. & SADIR, A. M. (1986). Fiebre aftosa. *Adel del Microbiol. Enf. Infecc.* Vol. 5, 22.
- SELLERS, R. F. (1971). Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. *Vet. Bull.* 41, 431
- SEVILLA, N. & DOMINGO, E. (1996). Evolution of persistent aphthovirus in cytolytic infections: partial reversion of phenotypic traits accompanied by genetic diversification. *Journal of Virology* 70, 6617-6624.
- SEVILLA, N., VERDAGUER, N. & DOMINGO, E. (1996). Antigenically profound amino acid substitutions occur during large population passages of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 225, 400-405.
- SHAHAN, M. S. (1962). The virus of foot and mouth disease. *Annals of the New York Academy of Science* 101, 444-454.
- SKINNER, H. (1953). One week old white mice as test animals in foot-and-mouth disease research. *Proc. XV Int. Congr. Stockholm* 1, 195.
- SOBRINO, F., PALMA, E. L., BECK, E., DAVILA, M., DE LA TORRE, J. C., NEGRO, P., VILLANUEVA, N., ORTIN, J. & DOMINGO, E. (1986). Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variation. *Gene* 50, 149-159.

- SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIZ, J. & DOMINGO, E. (1983). Multiple genetics variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128, 310-318.
- SPOONER, R. L., LEVEZIEL, H., GROSLAUDE, F. OLIVE, R. A. & VAIMAN, M. (1978). Evidence for a major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *Journal of Immunogenetics* 5, 335-346.
- STOCKER, M. & MC PHERSON, I. (1964). Syrian hamster fibroblasts cell line and its derivatives. *Nature* 203, 1355-1357.
- STROHMAIER, L. (1967). Virus concentration by ultracentrifugation. *Meth. Virol.* 3, 45-49.
- STROHMAIER, K., FRANCE, R. & ADAM, K. H. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *Journal of General Virology* 59, 295-306.
- SUTMOLLER, P., MC VICAR, J. W. & COTTRAL, G. E. (1968). The epizootological of foot-and-mouth disease virus carriers. *Arch. Fur die Gesamte Virusforschung* 23, 227-235.
- SUTMOLLER, P. & VIERA, A. (1980). The relationship of neutralizing antibody titers for foot-and-mouth disease virus and the protection of cattle. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 39-40, 57-62.
- TALBOT, P., ROWLANDS, D., BURROUGHS, J., SANGAR, D. & BROWN, F. (1973). Evidence for a group protein in foot and mouth disease particles. *Journal of General Virology* 19, 369-373.
- THOMAS, A., WOOTMEIJER, P., PUIJK, W. & BARTELLING, S. J. (1988), Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *Journal of Virology* 62, 2782-2789.
- VALLEE, H. & CARRE, H. (1922). Sur la puralité du virus aphteux. *Compt. Rnd. Hebdom. séances Acad. Sci. Paris.* 174, 207-208.
- VAN BEKKUM, J. G. (1969). Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMDV. Session of Research group of the standing Technical Committee of the European Commission for the control of foot and mouth disease, Brescia, Italy, Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, 38-41.
- VAN BEKKUM, j. G., FRENKEL, H. S., FEDERIKS, H. H. J. & FRENKEL, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneesk* 84, 1159-1164.
- VAN EIJK, M. J. T., STEWART-HAYNES, J. A. & LEWIN, H. A. (1992). Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene destinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 23, 483-496.

VAN LIEROP, M. J., NILSON, P. R., WAGENAAR, J. P. A., VAN NOORT, J. M., CAMPBELL, J. D. M., GLASS, E. J., JOOSTEN, I. & HENSEN, E. J. (1995). The influence of MHC polymorphism on the selection of T-cell determinants of FMDV in cattle. *Immunology* 84, 79-85.

VAN LIEROP, M. J., VAN MAANEN, K., MELOEN, R. H., RUTTEN, V. P. M. G., DE JONG, M. A. C. & HENSEN, E. J. (1992). Proliferative responses to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle. *Immunology* 75, 406-413.

VAN LIEROP, M. J., VAN NOORT, J. M., WAGENAAR, J. P. A., RUTTEN, V. P. M. G., LANGEVELD, J., MELOEN, R. H., & HENSEN, E. J. (1994). T cell-stimulatory fragments of foot-and-mouth disease virus released by mild treatment with cathepsin D. *Journal of General Virology* 75, 2937-2946.

VAN LIEROP, M. J., WAGENAAR, J. P. A., VAN NOORT, J. M. & HENSEN, E. J. (1995). Sequences derived from the highly antigenic VP1 region 140-160 of foot-and-mouth disease virus do not prime for a bovine T-cell response against intact virus. *Journal of Virology* 69, 4511-4514.

VASQUEZ, C., DENOYA, C. D., LA TORRE, J. L. & PALMA, E. L. (1979). Structure of foot and mouth disease virus capsid. *Virology* 97, 195-200.

VASQUEZ, C., PALMA, E. L. & BARRANTES, J. (1972). Foot and mouth disease virus. Capsid fine structure. *Journal of Microsc.* 14, 147-154.

VERDAGUER, N., MATEU, M. G., ANDREU, D., GIRALT, E., DOMINGO, E. & FITA, I. (1995). Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO Journal* 14, 1690-1696.

VERDAGUER, N., SEVILLA, N., VALERO, M. L., STUART, D., BROCCHI, E., ANDREU, D., GIRALT, E., DOMINGO, E., MATEU, M. G. & FITA, I. (1998). A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. *Journal of Virology* 72, 739-748.

VILLAVERDE, A., MARTINEZ-SALAS, E. & DOMINGO, E. (1988). 3D gene of foot-and-mouth disease virus. Conservation by convergence of average sequences. *Journal of Molecular Biology* 204, 771-776.

VILLAVERDE, A., MARTINEZ, M. A., SOBRINO, F., DOPAZO, J., MOYA, A. & DOMINGO, E. (1991). Fixation of mutation at the VP1 gene of foot-and-mouth disease virus: can quasispecies define a transient molecular clock? *Gene* 103, 147-153.

VOLPINA, O. M., YU SUROVOI, A. & IVANOV, V. T. (1990). Protection against viral infections with the aid of synthetic peptides. Foot-and-mouth disease as an example. *Biomed. Sci.* 1, 23-30.

WAGNER, G. G., CARD, J. L. & COWAN, K. M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by poliethylenglicol precipitation. *Arch Ges Virusforsch* 30, 343-350.

WALDMANN, O. & TRAUTWEIN, K. (1926). *Berl. Munch. tierarztliche Wochenschr.* 42, 569-570.

WILD, T. F. & BROWN, F. (1967). Nature of the inactivating action of trypsin on foot and mouth disease virus. *Journal of General Virology* 1, 247-250.

WINTHER, M. D., ALLEN, G., BOMFORD, R. H. & BROWN, F. (1986). Bacterially expressed antigenic peptide from foot-and-mouth disease virus capsid elicits variable immunological response in animals. *Journal of immunology* 136, 1835-1839.

XIE, Q. C., MC CAHON, D. CROWTER, J. R., BELSHAM, G. J. & MC CULLOUGH, K. C. (1987). Neutralization of foot and mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *Journal of General Virology* 68, 1637-1647.

ZAMORANO, P., WIGDOROVITZ, A., CHAHER, M. T., FERNANDEZ, F. M., CARRILLO, C., MARCOVECCHIO, F., SADIR, A. M. & BORCA, M. V. (1994). Recognition of B and T cell epitopes by cattle immunized with a synthetic peptide containing the major immunogenic site of VP1 FMDV O1 Campos. *Virology* 201, 383-387.

ZAMORANO, P., WIGDOROVITZ, A., PEREZ FILGUEIRAS, M., CARRILLO, C., ESCRIBANO, J. M., SADIR, A. M. & BORCA, M. V. (1995). A 10-amino-acid linear sequence of VP1 of foot-and-mouth disease virus containing B and T cell epitopes induces protection in mice. *Virology* 212, 614-621.

ZIBERT, A., MAASS, G., STREBEL, K., FALK, M. M. & BECK, E. (1990). Infectious foot-and-mouth disease virus derived from cloned full-length cDNA. *Journal of Virology* 64, 2467-2473.