Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología

Universidad de la República

RESPUESTA INMUNE EN RUMIANTES ASOCIADA A VACUNAS DE IMPORTANCIA VETERINARIA Y ESTUDIOS DE CORRELATOS INMUNOLÓGICOS DE PROTECCIÓN

MSc. Andrea Rossi

Dr. Alejandro Chablagoity
Director

Dr. Juan Martín Marqués
Co-director

Montevideo - Uruguay

Diciembre 2020

“You never fail until you stop trying”

Albert Einstein

A Guille, Inés y Alfredo
Por hacer mi sonrisa más brillante
y mi vida mejor

Agradecimientos

Muchos son los que me han acompañado en este periplo…

Comienzo por agradecerle a Ale, a quien conozco desde hace mucho tiempo y siempre confió y me brindó su apoyo. Gracias por aceptar mis tiempos.

A Juan, quiero agradecerle especialmente porque desde su llegada al laboratorio me acompañó, enseñó, alentó, y trabajó junto a mí.

A todos los Dres. Otto Pritsch, Patricia Zamorano y Rodrigo Puentes por aceptar evaluar este trabajo.

A las empresas productoras de vacunas veterinarias con las cuales hemos mantenido una colaboración desde hace unos cuantos años, y me han brindado la posibilidad de acceder a información, conocimiento y al material para mi formación y el desarrollo de esta tesis.

A Osvaldo Podhajcer y a los integrantes de su laboratorio, por recibirnos y permitirnos trabajar cómodamente.

A Julio Guarnaschelli, por su colaboración, compañerismo y buena disposición, sin la cual no hubiese sido posible el desarrollo de esta tesis.

A Andrés Iriarte, por su colaboración en el área bioinformática y por alentarme siempre.

A Analía y María les quiero agradecer particularmente por ser siempre solidarias con sus conocimientos y tiempos, por sus enseñanzas en citometría e inmunología y ayudarme con la escritura de esta tesis.

A todos mis compañeros del LVR!

A las "chicas del fondo" por estar siempre ahí! La "alegría del hogar" las quiere!

A mis adoradas Analía, Karina, Marinela, Marichu, Nati, Rose y Rosina.

A Fer, Lauri, Arací, Lu V., Normis, Mono, Amy, Mariana, Geraldine, Polin, y Vicky Perez, por los mates y las risas, por estar siempre.

A mi familia:

A mi mamá, por su amor, fortaleza y resiliencia. A mi adorada Mariana. A Fer, por querer ser parte de esta pequeña familia de tres "pelitos". A mi papá, Martha, Seba y Ale. A mis abuelas adoradas María y Nené.

A Alfredo por ser quién es, por su amor, fortaleza y entusiasmo por vivir, y por acompañarme sin condiciones. Gracias por la familia que hemos construido.

Por último, a mi adorado Guille, el "más hermoso", que con sus ganas por permanecer me enseñó cuales son las cosas importantes de la vida; y a "Inés de mi alma mía" que, desde su inocencia, me completó con su frescura, imaginación y carcajadas.

RESUMEN

El área de vacunas veterinarias ha sufrido una gran dinamización, llevando a que el sector aplique rigurosas regulaciones, similares a las aplicadas a las vacunas de uso humano. A pesar del alto grado de eficacia e inocuidad que han alcanzado las vacunas virales o bacterianas, aún se desconoce en la mayoría de los casos los mecanismos inmunológicos por los cuales inducen protección en el huésped. Así, es de central importancia definir en forma más precisa correlatos de protección, tanto para desarrollar racionalmente nuevas vacunas como para evaluar su eficacia de manera más certera. En este contexto, este trabajo se enfocó en avanzar en el conocimiento de respuestas inmunes asociadas a la vacunación de bovinos y ovinos, contra enfermedades veterinarias de importancia mundial. Para ello, tomamos como modelos de estudio la fiebre aftosa y las enfermedades clostridiales.

La fiebre aftosa es una de las enfermedades infecciosas de más alto impacto a nivel mundial y las medidas de control dependen del status sanitario que tiene cada país. En particular las vacunas, disponibles desde principios de la década de 1900, han sido fundamentales para controlar la fiebre aftosa en diferentes partes del mundo, sin embargo la enfermedad aún afecta a millones de animales y sigue siendo la principal barrera sanitaria para el comercio de animales y sus derivados. En general, se asume que los anticuerpos son un correlato de protección, pero hay indicios claros de que el panorama es más complejo. En este contexto, buscamos avanzar en la definición de biomarcadores más precisos de vacunación y protección, mediante el análisis de la respuesta transcripcional global en bovinos. Para ello, en primera instancia utilizamos al IFN-γ, postulado previamente como marcador asociado a protección, y pusimos a punto el sistema de estimulación *in vitro* con antígeno y posterior evaluación transcripcional. Luego, comparamos la respuesta transcripcional de bovinos Vacunados *v*s Naïve, donde surgieron varios procesos biológicos activados en respuesta a la vacunación contra la fiebre aftosa, que nos permitieron seleccionar ciertos marcadores asociados a vacunación. En una segunda instancia, comparamos bovinos vacunados y protegidos contra bovinos vacunados y no protegidos. Los animales fueron seleccionados en función de los datos clínicos del desafío. De dichas comparaciones definimos dos *"firmas moleculares"* una de vacunación y otra de respuesta protectiva contra la fiebre aftosa. Estos set de genes o marcadores, nos permiten diferenciar bovinos vacunados exitosamente (o sea protegidos), de vacunados y no protegidos y de animales naïve, y así contribuir a la generación de herramientas, alternativas a los métodos tradicionales, para evaluar la eficacia de vacunas.

En otro aspecto del trabajo, nos focalizamos en las clostridiosis que son un grupo de enfermedades toxi-infecciosas producidas por bacterias del género *Clostridium* y que pueden terminar con la muerte del animal. Las vacunas policlostridiales son la principal medida profiláctica aplicada en el ganado contra estas enfermedades. Los anticuerpos contra

Clostridium han sido considerados durante mucho tiempo como el principal correlato de la protección inducida por la vacuna. Sin embargo, la dinámica de los anticuerpos específicos circulantes en la especie de destino no ha sido estudiada exhaustivamente. Así es que tomamos como punto de partida evaluar la respuesta humoral frente a las vacunas policlostridiales en ovinos a lo largo de un año. Nuestros resultados mostraron que se inducen anticuerpos con una gran variación interindividual contra todas las especies de clostridios incluidas en la vacuna, y luego del día 90 disminuyen notablemente, siendo indetectables en la mayoría de los animales al año. Si bien es sabido que el esquema de revacunación anual es eficaz controlando la enfermedad clostridial, nuestros resultados sugieren que los anticuerpos circulantes no serían el único correlato de protección. Para aproximarnos al estudio en este aspecto, estudiamos la respuesta celular y humoral en bovinos vacunados con vacunas policlostridiales y desafiados con *C. chauvoei*, especies incluida en la vacuna. Observamos que la vacunación inducía una respuesta celular pro-inflamatoria, con expresión de los ARNm de IFN-γ, IL-17, TNF-α y TGF-β, que protegería a los bovinos contra el desafío con esporas de *C. chauvoei*. A las 24 h post-desafío, nuestros resultados mostraron que se inducía una inhibición de la proliferación policlonal de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, y de la expresión del ARNm de IFN-γ, IL-17, IL-4, TNF-α y TGF-β, mientras que la respuesta humoral no mostró variaciones.

En suma, avanzamos en el conocimiento de las respuestas inducidas por vacunas contra enfermedades veterinarias y definimos posibles candidatos de correlatos inmunológicos de protección en especies de destino. En tal sentido, esperamos contribuir al área aportando herramientas para mejorar los métodos de evaluación de eficacia de estas vacunas.

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD; del inglés *7-Aminoactinomycin D*
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico copia
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ASC: del inglés *specific antibody-secreting cells*
β2M: beta-microglobulina
CV: coeficiente de variación
CFSE: del inglés *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
ConA: Concanavalina A
dpv: días post-vacunación
DS: desvío estándar
DC: del inglés *dendritic cell*
EPP: porcentaje de protección esperado
FACS: del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*
FSC: del inglés: *Forward Scatter*
GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
IL: Interleuquina
IFN: Interferon
ISG: del inglés IFN-stimulated gene
NF-κB: del inglés, Nuclear Factor Kappa B
NLR: del inglés, *Nod Like Receptor*
NLRC4: del inglés, *NLR Family, CARD domain containing*
NSP: proteínas no estructurales
PAMP: del inglés, *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PBL: del inglés *Peripheral Blood Lymphocytes*
PBMC: del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PPG: del inglés *protection against podal generalization*
P.I.: del inglés Proliferation Index
PMA: del inglés, phorbol myristate acetate
PMN: del inglés, *Polimorphonuclear Neutrophils*
PRR: del inglés, *Pattern Recognition Receptor*
qPCR: del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*
RT: *Retrotranscripción*
SEM: del inglés *Standard Error of the Mean*
SFB: del inglés Serum Fetal Bovine
SSC; del inglés: *Side Scatter*
STING: del inglés, *Stimulator of Interferon Genes*
TCR: del inglés, *T-Cell Receptor*
TGF-β: del inglés, Transforming Growth Factor beta
Th: del inglés, *T helper*
TLR: del inglés, *Toll Like Receptor*
TNF-α: del inglés, *Tumoral Necrosis Factor alpha*
UA: Unidades arbitrarias

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: **INTRODUCCIÓN** **1**

1.1 Vacunas Veterinarias ***2***

1.1.1 Generalidades 2

1.1.2 Correlatos de protección 5

1.1.3 Vacunas veterinarias producidas en Uruguay 8

1.2 Fiebre Aftosa ***9***

1.2.1 Enfermedad y agente etiológico 11

1.2.2 Respuesta inmune contra FMDV 14

1.2.2.1 Inducción de la respuesta inmune innata durante la infección 14

1.2.2.2 Respuesta humoral 18

1.2.2.3 Desarrollo de inmunidad celular 20

1.2.3 Vacunas contra la Fiebre Aftosa 23

1.2.3.1 Generalidades 23

1.2.3.2 Inmunidad asociada a la vacunación contra la fiebre aftosa 27

1.3 Clostridiosis ***28***

1.3.1 *Clostridium* spp. y las enfermedades clostridiales 28

1.3.2 Respuesta inmune contra *Clostridium* spp. 31

1.3.3 Vacunas clostridiales 34

1.3.3.1 Generalidades 34

1.3.3.2 Inmunidad asociada a la vacunación clostridial 35

1.4 Objetivos ***39***

1.4.1 Objetivo general 39

1.4.2 Objetivos específicos 39

CAPÍTULO 2: **MATERIALES Y MÉTODOS** **40**

2.1 Diseño experimental y muestreo ***41***

2.1.1 Modelo Aftosa 41

2.1.1.1 Animales 41

2.1.1.2 Vacunas 41

2.1.1.3 Ensayos de vacunación 41

2.1.1.4 Ensayos de vacunación/desafío 42

2.1.2 Modelo Enfermedades Clotridiales 43

2.1.2.1 Animales 43

2.1.2.2 Vacunas 43

2.1.2.3 *Ensayo A* 44

2.1.2.4 *Ensayo B* 45

2.2 Antígenos 45
2.2.1 Modelo Aftosa 45
2.2.2 Modelo Enfermedades Clotridiales 46
2.2.2.1 Antígenos vacunales 46
2.2.2.2 Antígenos para estimulación *in vitro* 47
2.2.2.3 Antígenos sensibilizantes (ELISA) 47
2.3 Ensayos de estimulación in vitro 47
2.3.1 Modelo Aftosa 47
2.3.1.1 Estimulación de sangre entera 47
2.3.1.2 Estimulación de PBMC 48
2.3.2 Modelo Enfermedades Clotridiales 48
2.3.2.1 Estudio del perfil de expresión génica de citoquinas 48
2.3.2.2 Ensayos de linfoproliferación 49
2.4 RT-qPCR 49
2.4.1 ARN 49
2.4.2 Retrotranscripción (RT) 50
2.4.3 PCR en Tiempo Real 50
2.5 Ensayos de microarray 51
2.6 Preparación de sueros 52
2.7 ELISA 52
2.8 Citometria de flujo 53
2.9 Análisis estadístico 54

***CAPÍTULO 3:* RESULTADOS Y DISCUSIÓN 55**

***SECCIÓN 3.1:* FIEBRE AFTOSA 56**
3.1.1 Estrategia experimental 57
3.1.1.1 Optimización de técnicas y protocolos 58
3.1.1.2 Transporte de las muestras de sangre 59
3.1.1.3 Ensayos de vacunación/desafío contra FMDV 59
3.1.2 Elección de biomarcadores vacunación contra FMDV por RT-qPCR 61
3.1.2.1 Análisis del perfil de expresión génica de citoquinas 61
3.1.2.1.1 Expresión del ARNm de IFN-γ 62
3.1.2.1.2 Expresión del ARNm de IL-17 64
3.1.2.1.3 Expresión del ARNm de IL-4 65
3.1.2.1.4 Expresión del ARNm de IL-10 65
3.1.2.1 Correlación entre la expresión de ARNm IFN-γ y la serología 66
3.1.3 "Firma molecular" asociada a la vacunación contra FMDV 67
3.1.3.1 Comparación Vacunados *vs* Naïve 69
3.1.3.1.1 Selección de los bovinos 69

3.1.3.1.2 Análisis de la respuesta transcripcional 70
3.1.3.2 Comparación Vacunados Protegidos *vs* Vacunados No-Protegidos 72
3.1.3.2.1 Selección de los bovinos 72
3.1.3.2.2 Análisis respuesta transcripcional 74
3.1.3.3 Definición de "*Firma Molecular*" en la vacunación contra FMDV 76
3.1.4 Discusión ***84***
3.1.4.1 Optimización de la logística de trabajo 86
3.1.4.2 IFN-γ como marcador de vacunación y protección contra FMDV 88
3.1.4.3 "*Firma molecular*" en la vacunación contra FMDV 92
SECCIÓN 3.2: **ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES** **96**
3.2.1 Estudio de la respuesta inmune inducida por la vacunación contra Clostridium spp. ***97***
3.2.1.1 *Ensayo A* 98
3.2.1.1.1 Análisis de la respuesta humoral 98
I. Ensayo en ovinos 100
a) Análisis de la respuesta la respuesta de anticuerpos específicia 100
ii) Evolución temporal de la respuesta humoral 103
II. Ensayo en bovinos 104
3.2.1.1.2 Análisis de la respuesta celular 104
I. Ensayo en ovinos 106
II. Ensayo en bovinos 106
3.2.1.1.3 Análisis de los resultados del "*Ensayo A*" 108
3.2.1.2 *Ensayo B* 108
3.2.1.2.1 Análisis de la respuesta humoral 109
3.2.1.2.2 Análisis de la respuesta celular 110
3.2.1.2.3 Análisis de los resultados del "*Ensayo B*" 111
3.2.2 Estudio de la respuesta inmune asociada a la protección inducida por la vacunación contra Clostridium spp. ***112***
3.2.2.1 Ensayo Vacunación y Desafío 112
3.2.2.2 Análisis de la respuesta inmune 113
3.2.2.2.1 Respuesta humoral 113
3.2.2.2.2 Respuesta celular 114
I. Perfil de expresión génica de citoquinas 114
II. Linfoproliferación celular 116
3.2.2.3 Análisis de los resultados frente al desafío del "*Ensayo B*" 118
3.2.3 Discusión. ***119***
3.2.3.1 Respuesta inmune asociada a la vacunación contra *Clostridium* 119
3.2.3.2 Respuesta inmune asociada a la protección contra *Clostridium* 125
CAPÍTULO 4: **CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS** **131**

CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA 136

CAPÍTULO 6: PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA & TÉCNICA ASOCIADA A LA TESIS 151

6.1 Publicaciones derivadas de la Tesis 152

6.2 Presentaciones en Congresos 152

6.3 Manuscritos en Preparación 152

ANEXOS 153

Anexo 1: Secuencias de primers y sondas Taqman de bovinos y ovinos 154

Anexo 2 : Optimización de técnicas para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR 158

Anexo 3: Lista de genes surgidos del análisis de microarray 167

Anexo 4: Resultados de test de enriquecimiento y REACTOME 177

Anexo 5: Artículo científico 184

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 | *VACUNAS VETERINARIAS*

Las vacunas son consideradas una de las intervenciones de mayor impacto sobre la salud mundial luego de la introducción del agua potable. Ninguna otra intervención, ni siquiera los antibióticos, ha tenido un efecto tan importante en la reducción de la mortalidad y el crecimiento de la población. La estimulación deliberada de una respuesta inmune por inmunización o vacunación para proteger al hombre contra enfermedades con una significativa morbilidad y mortalidad, tiene una corta historia, sin embargo la aplicación de programas de inmunización masiva han llevado al control y/o erradicación de varias de éstas enfermedades (Plotkin and Plotkin, 2012).

Más allá del impacto real de las vacunas humanas en la salud, muchas enfermedades infecciosas siguen aún causando muertes en todo el mundo. En este sentido, la investigación en las ciencias biomédicas y los avances biotecnológicos han permitido el desarrollo de nuevas formulaciones y el mejoramiento de las actuales. Los avances en el área de la inmunología, no sólo han permitido ampliar el entendimiento de cómo el sistema inmune reconoce y controla las infecciones, sino que también han aportado al conocimiento de los mecanismos de protección y desarrollo de inmunidad a largo plazo inducidos por vacunas. No obstante, considerando que las vacunas más exitosas han sido desarrolladas empíricamente, aún resta comprender cómo son los mecanismos de acción de muchas de ellas y cómo podemos mejorar su eficacia. En el contexto del área de vacunas veterinarias, la falta de conocimiento de sus mecanismos de acción y protección es más significativa como consecuencia de una menor inversión en investigación y desarrollo de vacunas animales.

1.1.1 | Generalidades

Los programas de sanidad animal, destinados a la prevención, control y erradicación de enfermedades de importancia en la producción pecuaria y en la salud pública, en su gran mayoría incluyen la administración de vacunas a la especie de destino. Las vacunas veterinarias autorizadas actualmente son a microorganismos atenuados, inactivados, a subunidades o toxoides. En general, se acepta que las vacunas atenuadas pueden ser muy eficaces porque inducen respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales, pero pueden presentar riesgo potencial de reversión del microorganismo a un fenotipo virulento. Las vacunas inactivadas son típicamente más seguras, aunque pueden ser menos eficaces que las atenuadas. Por último, las basadas en toxoides presentan una complejidad extra debido al uso de componentes complejos en el medio de cultivo para su producción (Jorge and Dellagostin, 2017).

Para muchas enfermedades animales, la vacunación es la principal medida de control. Por tanto, las vacunas deben ser seguras, potentes y eficaces, y además ser económicas para asegurar una mayor cobertura. En consecuencia, los estándares y controles de producción son imprescindibles para asegurar la disponibilidad de productos uniformes de buena calidad para el uso en los programas de Sanidad animal. Los métodos y requisitos exigidos para la comercialización de las vacunas pueden variar de un país a otro y se especifican en las regulaciones regionales o locales, en particular en la Farmacopea Europea (*Ph. Eu.*), en el Código Federal de Regulaciones de Estados Unidos (CFR), y a nivel regional en la Norma MERCOSUR. Las regulaciones exigen controles de calidad, potencia, inocuidad y esterilidad para cada lote de vacunas producido, mientras que para registrar una nueva vacuna para su comercialización se requieren además controles de eficacia (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019).

Si nos centramos en las vacunas dirigidas al ganado, su administración puede ser programada para proporcionar inmunidad durante los períodos estacionales de vulnerabilidad (por ejemplo, antes de la reproducción) o durante los períodos de estrés relacionado con la producción (como los períodos previos o posteriores al destete). El éxito de la inmunización depende de la eficacia clínica de la vacuna, su potencia inmunológica, la administración efectiva de la misma y el uso de estrategias sólidas para el manejo del rebaño. Los programas de inmunización bien diseñados tienen un papel importante en el control de brotes de enfermedades en el ganado, y su éxito depende del uso coordinado y efectivo de una vacuna eficaz junto con otras medidas de control requeridas. Los esfuerzos para mejorar las características clave de las vacunas (como el inicio y duración de la inmunidad, seguridad y eficacia) permitirán una mayor utilidad de las vacunas para el control de brotes (Mcvey and Shi, 2010).

La administración de las vacunas veterinarias impacta no sólo en el área de la salud y bienestar animal, sino también sobre la producción de alimentos y la salud humana. La inmunización de los animales generalmente se considera como el método más rentable para prevenir enfermedades en animales, mejorar la eficiencia de la producción de alimentos, y reducir o prevenir la transmisión de infecciones zoonóticas o transmitidas por alimentos a los seres humanos. En este sentido, las vacunas animales han sido desarrolladas y autorizadas para una variedad de propósitos, a diferencia de las vacunas humanas que tienen como objetivo principal la salud y bienestar de la población (Roth, 2011). Aun así, estas vacunas en su gran mayoría son utilizadas para prevenir enfermedades infecciosas, y han sido efectivas reduciendo significativamente el impacto de algunas enfermedades importantes tanto en el ganado como en animales de compañía. Se estima que hay disponibles vacunas veterinarias para más de 400 enfermedades que afectan a mamíferos, aves y peces, incluidos animales de granja, mascotas y vida silvestre [revisado en (Knight-Jones et al., 2014)].

Más allá de la gran disponibilidad de vacunas animales, Thomas y colaboradores han sugerido que el área veterinaria necesitaría demostrar el valor de las campañas de vacunación utilizando análisis de costo-efectividad de éstas sobre las poblaciones diana, dado que son escasos los datos sobre los impactos socioeconómicos y de farmacovigilancia. Una mejor apreciación de los beneficios económicos y sociales de la vacunación veterinaria ayudaría a su aceptación por parte de los productores rurales y los gobiernos nacionales (Thomas et al., 2019). La industria productora de vacunas veterinarias ha experimentado una importante expansión a nivel mundial en las últimas décadas (Fig. 1-1A). El mercado de vacunas veterinarias se valoró en USD 7,226 millones en 2018 y se espera que registre un aumento aproximado del 5 al 6%, durante el período de 2019-2024 (Fig. 1-1B). Los principales motores de esta expansión han sido la creciente población ganadera, mayor demanda de proteínas animales, preocupación por la seguridad alimentaria, creciente adopción de animales de compañía y mayor gasto en atención médica para ellos, y constatación de brotes de enfermedades zoonóticas y ganaderas (Fig. 1-1C). Esta expansión ha llevado a que el mercado de vacunas veterinarias se vuelva bastante competitivo, donde empresas productoras importantes con fuerte presencia global, se enfrentan a una intensa competencia con las industrias de países emergentes (Grand View Research, 2019; Research and Markets, 2019).

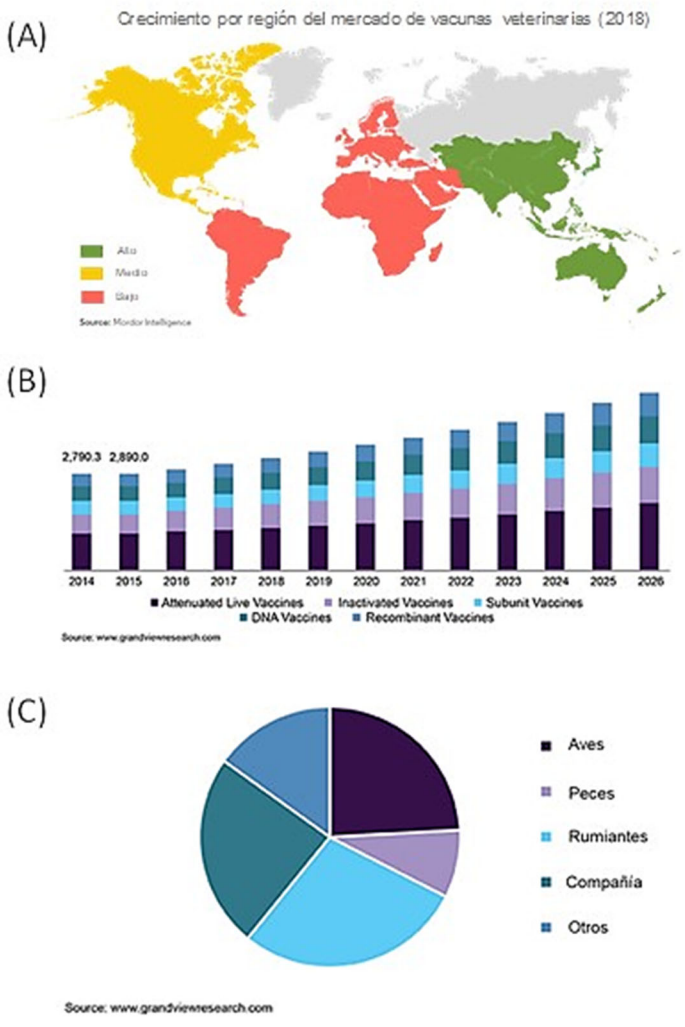

Figura 1-1. Mercado mundial de vacunas veterinarias. En (A) se muestra el crecimiento por región del mercado de vacunas registrado en 2018. En (B) se muestra el crecimiento de los diferentes tipos de vacunas desde el 2014 al 2018 y la proyección por año hasta el 2026 en Estados Unidos. En (C) se muestra el porcentaje de vacunas producidas a nivel global, por animal. Gráficos adaptados de (Grand View Research, 2019; Research and Mrrkets, 2019)

La dinamización del área de vacunas veterinarias, ha llevado a que las industrias deban enfrentarse a exigencias cada vez más fuertes en los procesos de control y validación de la efectividad de las mismas, con regulaciones cercanas a las de vacunas de uso humano (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019). Las actividades de innovación son consideradas por las propias

industrias como fundamentales para mantener la competitividad en el mercado, por lo cual el gasto destinado I+D es importante y está focalizado mayormente en la innovación dirigida hacia nuevos productos, y a la mejora del equipamiento, y de los procesos de control y validación (Grand View Research, 2019; Research and Markets, 2019). A nivel mundial, existe una tendencia de las industrias a tercerizar esta actividad dado que el desarrollo de sus propios laboratorios de I+D implica una gran inversión y por ende un menor margen de ganancias (Bittencourt et al., 2010).

1.1.2 | Correlatos de protección

Las vacunas humanas y animales provocan un sin número de respuestas inmunes, que no tienen por qué contribuir todas con la inmunidad protectiva. Para desarrollar vacunas eficaces es fundamental poder definir la calidad de la respuesta inmune que confiere protección contra la infección y determinar los mecanismos mediante los cuales el sistema inmune genera la respuesta protectora. Esto último es crucial para evaluar qué parámetros inmunológicos son estimulados por la vacunación (es decir, correlatos de inmunogenicidad) o están asociados con la protección contra infecciones posteriores (es decir, correlatos de protección) (Siegrist, 2012).

En las últimas décadas han surgido nuevos métodos que permiten la evaluación de un número creciente de parámetros inmunes asociados a la vacunación, llevando a plantearse cuales serían los mejores marcadores a evaluar y cuál sería su correlación con la protección inducida por vacunas. La identificación de correlatos inmunes, sustitutos, de la eficacia de la vacuna es uno de los puntos más importante tanto en el proceso de desarrollo de nuevas vacunas como en la optimización de las estrategias de inmunización de las vacunas ya disponibles (Siegrist, 2012). La eficacia de una vacuna debe demostrarse para cada componente y los criterios para evaluarla pueden variar desde la incidencia de la enfermedad hasta un correlato de protección bien establecido. Sin embargo, no siempre es factible utilizar el desarrollo de los síntomas clínicos de una enfermedad para evaluar la eficacia de una vacuna volviéndose imprescindible utilizar criterios de valoración sus títulos para predecir la protección o el beneficio clínico significativo (Thakur et al., 2012).

La gran mayoría de los correlatos de protección descritos en la bibliografía han sido deducidos a partir de diferentes estudios como ser: administración pasiva de anticuerpos, análisis de respuestas inmunes en sujetos protegidos y no protegidos en la naturaleza, ensayos de eficacia de vacunas, u observaciones de individuos inmunosuprimidos (Plotkin and Gilbert, 2012). Asimismo, muchos estudios describen marcadores inmunes con una probable funcionalidad biológica pero no se demuestra su correlación estadística con la protección (Thakur et al., 2012). En consecuencia, se observa que la información sobre los correlatos es compleja y confusa. En este sentido, es que Plotkin sugiere que para definir un correlato de protección deberían considerarse factores cualitativos que pueden influir, entre los cuales están

factores del hospedero tales como edad, susceptibilidad genética asociada a la presencia de ciertos tipos de complejos de histocompatibilidad (MHC), sensibilización previa con organismos relacionados antigénicamente con el patógeno o diferencias étnicas. Asimismo, deben ser contemplados los factores del patógeno, principalmente la dosis infectiva, debido a que grandes dosis requieren respuestas inmunes del hospedero más potentes para proteger. Además, hay que considerar no solo contra que se quiere proteger al hospedero (infección sintomática o asintomática, infección de mucosas, invasión, etc.), sino también en qué momento se evalúa la respuesta inmune, puesto que puede dar resultados diferentes si se analiza en el pico de respuesta después de la vacunación o justo antes de la exposición a la infección o desafío (Plotkin, 2013).

Plotkin y Thakurhan revisado la bibliografía relacionada a los posibles correlatos inmunes de protección en vacunas humanas (Tabla 1-1). En términos generales, surgen diferentes parámetros inmunológicos, humorales y mediados por células, que han sido evaluados como correlatos de protección. El éxito para la mayoría de las vacunas licenciadas, desarrolladas empíricamente y para las cuales se desconoce mayormente el mecanismo de protección inmune, está asociado con la inducción de fuertes respuestas inmunes humorales al producir células plasmáticas de larga vida. Sin embargo, los autores han cuestionado el rol de los anticuerpos como principal correlato de protección, principalmente para vacunas contra patógenos intracelulares. Si bien Plotkin y Thakur, consideran que en algún punto de la patogénesis la mayoría de los patógenos son susceptibles a la neutralización por anticuerpos, también asumen que en general la respuesta inmune mediada por células sería central para la protección contra patógenos intracelulares. En este sentido, reportan que ha sido promovida la producción antígeno-específica de IFN-γ, asociada a respuestas de tipo Th1, como un marcador cuantitativo de respuestas inmunes protectivas mediadas por células. Sin embargo, otros estudios han sugerido que un aumento de los niveles de células T polifuncionales

Parameter	Response/mechanism	Correlate of protection
Humoral		
Neutralizing antibodies	Humoral	Correlate
Serum IgG	Humoral	Correlate
Mucosal IgG, IgA	Humoral	Correlate
Cell-mediated		
IFN-γ	T_H1	Inconsistent data
TNF-α	T_H1	ND
IL-2	T_H1	ND
IL-17	T_H17	ND
IL-1, 4, 10	T_H2	ND
IFN-γ, TNF-α, IL-2	Polyfunctional T cells	Inconsistent data
MHC class I and II tetramer-specific T cells	MHC restriction	ND
$CCR7^{hi}$, $CD45RA^{+}$, $CD62^{hi}$, $CD44^{+}$, $CD127^{hi}$, $CD27^{+}$, $CD28^{+}$	T_{CM}: IL-2, IFN-γ^{low}, IL-4^{low}, IL-$17A^{low}$	Inconsistent data
$CCR7^{low}$, $CD45RA^{-}$, $CD62^{low}$, $CD44^{+}$, $CD127^{low}$, $CD27^{+/-}$, $CD28^{+}$	T_{EM}: IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-17A	Inconsistent data
$CD27^{+}$, $FCRL4^{+}$	Memory B cells, humoral	Surrogate
γδ TCR^{+}, $CD3^{+}$	γδ T cells: IFN-γ, IL-17A, IL-17F, IL-22	ND
$CD3^{low}CD56^{+}$NKT cells	IFN-γ, IL-17A, IL-4	ND

ND, not determined.

Tabla 1-1. Parámetros inmunológicos evaluados como posibles asociados a vacunas humanas. Adaptada de Thakur et al., 2012.

antígeno específicas, capaces de producir la tríada de citoquinas (IFN-γ, TNF-α e IL-2) podría llegar a ser un mejor correlato de inmunidad protectiva. No obstante, no ha sido posible definir un correlato de protección asociado a la respuesta inmune mediada por células, con la excepción de las células B de memoria, que fueron correlacionadas con la protección (Tabla 1-1) [revisado en (Plotkin, 2013; Thakur et al., 2012)].

En este contexto, la necesidad de obtener una visión global y holística de cómo el sistema inmune interactúa con otros sistemas biológicos, y cómo estas interacciones gobiernan la respuesta a una vacuna, ha conducido a emplear la "*Biología de Sistemas"*. La capacidad de evaluar exhaustivamente la actividad biológica es una parte integral de la "*Biología de sistemas*", y las tecnologías "*Ómicas*" de alto rendimiento ("*high-throughput*") han permitido interrogar las respuestas biológicas a nivel de genes, ARNm, proteínas, metabolitos o células. Su aplicación en el estudio de vacunas humanas ha aportado nuevos conocimientos sobre los mecanismos de inmunidad y han definido "*firmas moleculares*" que se correlacionan con la inmunidad inducida por vacunas y la predicen. Delinear "*firmas moleculares*" específicas de la inmunogenicidad de una vacuna permitirá definir nuevos correlatos de inmunidad y de protección más precisos, a partir de los cuales se podría explicar mejor la heterogeneidad de las respuestas de la vacuna en una población (Nakaya and Pulendran, 2015; Pezeshki et al., 2019; Siegrist, 2012).

Dentro del área de la medicina veterinaria, también hay un interés creciente en caracterizar los mecanismos por los cuales las vacunas inducen protección. Sin embargo, no hay grandes avances en la definición de correlatos en animales pues hay una importante limitación con los reactivos y es muy amplio el rango de hospederos y de patógenos. No obstante, al igual que en las vacunas humanas, la protección de la mayoría de las vacunas veterinarias ha sido correlacionada con la inducción de fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes (Thakur et al., 2012). Las agencias reguladoras han tomado este correlato para establecer niveles mínimos de anticuerpos, a partir del cual se asegura que la especie de destino está protegida frente a esa enfermedad (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019). El otro parámetro evaluado como posible correlato de protección frente a la infección es la producción de IFN-γ. Uno de los ejemplos icónicos es el reportado en bovinos infectados contra *Mycobacterium bovis*, en los cuales la respuesta protectiva estaría asociada con altos niveles de producción de IFN-γ. Sin embargo, aún continúa en discusión cual sería la fuente de producción de dicha citoquina y se ha sugerido que podrían ser células tipo Th1, T $CD8^+$, T $CD4^+$ polifuncionales o células Tγδ (Lewinsohn et al., 2017; Mcgill et al., 2014; Sánchez López et al., 2018). A partir de este correlato, se desarrollaron kits que utilizan la detección de IFN-γ en suero o plasma y permiten diferenciar bovinos infectados o vacunados contra *M. bovis*. En particular, la OIE validó y certificó un kit que actualmente se utiliza para diagnosticar la enfermedad (OIE, 2012).

1.1.3 | Vacunas veterinarias producidas en Uruguay

Nuestro país no ha sido ajeno a la expansión de la industria de vacunas veterinarias, experimentando un importante crecimiento en las dos últimas décadas. En el período entre el 2004 y 2007, se convirtió en un sector relevante en la generación de nuevas exportaciones, alcanzando una tasa anual de crecimiento del 4,8% (Snoeck et al., 2007). La industria farmacéutica veterinaria constituye gran parte de la industria biotecnológica de nuestro país, con una representación de al menos tres empresas que producen y exportan productos desde Uruguay. Los destinos de las exportaciones son principalmente Sudamérica, países de Oriente y África, concentrando casi 40% de las exportaciones de biotecnología del país y en franco crecimiento desde 2012 (CIU, 2018; Veritrade.com, 2019).

Cabe destacar que estas industrias nacionales enfrentaron un proceso de reconversión cuando la OIE declaró al país "*libre de aftosa sin vacunación*" en 1996. Con dicha declaración, sobrevino la prohibición legal (Decreto 261/994) de mantener en Uruguay cepas del virus de la fiebre aftosa para cualquier fin (Presidencia de la República Oriental del Uruguay, 1994), obligando a las empresas a sustituir la producción de vacunas contra aftosa. En esta reconversión, adquirieron protagonismo tanto la producción de biológicos, en particular vacunas bacterianas y virales así como también la producción de antibióticos y antiparasitarios (Bittencourt et al., 2010; Snoeck et al., 2007). En estos últimos años, dos de las tres principales empresas nacionales productoras de vacunas veterinarias fueron adquiridas por empresas multinacionales, llevando a esta industria hacia una nueva reconversión que ha colaborado con el crecimiento sostenido del sector (CIU, 2018; Veritrade.com, 2019).

Acompañando la tendencia mundial a invertir en más I+D, las industrias uruguayas han incrementado su vinculación con el sector académico desde su reconversión, con el objetivo de incorporar valor agregado a sus productos. En particular, nuestro grupo de trabajo ha mantenido colaboraciones de largo aliento con empresas tanto locales como regionales, y en el marco de las mismas hemos implementado metodologías de identificación, control y validación de los productos. Es importante destacar que estos desarrollos han sido transferidos a las empresas para su uso en el control de producción de vacunas, brindándoles una ventaja competitiva en el mercado debido a que les permite producir vacunas con un diseño racional.

En este contexto, y como fruto de estas interacciones con la industria, surgieron nuevos temas de investigación básicos y aplicados que dieron origen a la presente tesis. En particular, nos enfocaremos en vacunas, para bovinos y ovinos, contra enfermedades de importancia mundial como lo son la fiebre aftosa y las enfermedades clostridiales. A continuación, introducimos las generalidades de los agentes etiológicos y de las vacunas contra ambas enfermedades veterinarias.

1.2 | *FIEBRE AFTOSA*

La fiebre aftosa es considerada como una de las enfermedades animales con mayor impacto a nivel mundial, generando grandes pérdidas económicas en diversas actividades, incluido el turismo, agricultura y comercio, y por ende un importante impacto a nivel social. El virus de la fiebre aftosa (FMDV, del inglés *Foot-and-Mouth Disease Virus*) se considera un patógeno difícil de erradicar por su alta tasa de replicación, gran transmisibilidad, amplio tropismo de especies y diversidad antigénica.

En los últimos 70 años, la vacuna a virus inactivado, administrada como parte de las campañas de control, ha jugado un papel importante en la erradicación del virus en ciertas regiones del mundo. Sin embargo, en las últimas décadas se ha visto un renovado interés público y político de esta enfermedad debido al resurgimiento de la misma, constatándose importantes brotes en países sin registro de fiebre aftosa (de los Santos et al., 2018; Rodriguez and Grubman, 2009). Debido al éxito de las campañas de vacunación y a estrictas medidas de control, la fiebre aftosa ha sido erradicada de Europa, América del Norte y algunos países de Asia, y ha permitido controlar eficazmente la enfermedad en zonas de África y la mayor parte de América del Sur. Sin embargo, la enfermedad ha resurgido en diferentes regiones del mundo, lo cual representa una amenaza continua tanto para los países libres de fiebre aftosa como para las zonas donde la enfermedad es endémica. Factores tales como el aumento y la globalización del comercio, la migración creciente, la dinámica del mantenimiento del ganado y de la vida silvestre, la falta de recursos para apoyar programas de vacunación sostenidos, la baja cobertura antigénica de las vacunas actuales, o el intercambio de los serotipos circulantes entre diferentes regiones, han incidido en el resurgimiento de la fiebre aftosa (de los Santos et al., 2018). La circulación del FMDV en forma endémica ha producido un importante número de brotes como los registrados en el norte de África, Medio Oriente y Turquía en los años 2012/2014/2015, o en Japón y Corea del Sur en los años 2010/2011 y 2014/2015/2016, causando grandes pérdidas económicas y crisis internacionales por la propagación del virus a los países vecinos. Sin embargo, más allá de la vacunación masiva, el principal desafío continúa siendo la implementación de controles efectivos en el movimiento de animales y medidas de bioseguridad. En lo que respecta a América del Sur, no se han registrado brotes de fiebre aftosa desde principios de 2012, y cada vez más países o zonas obtienen un estado oficial sin fiebre aftosa, principalmente con la vacunación en curso (Knight-Jones et al., 2016a).

La fiebre aftosa está inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres, elaborado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Debido a su capacidad altamente contagiosa y a las repercusiones económicas y sociales, fue la primera enfermedad para la cual la OIE estableció una lista oficial de países y zonas reconocidos libres con o sin vacunación, en función del estatus sanitario respecto a la fiebre aftosa (OIE, 2019). Dicho

estatus sanitario se establece por país o zona y comprende las siguientes categorías: libre de fiebre aftosa sin vacunación y libre de fiebre aftosa con vacunación (Fig. 1-2).

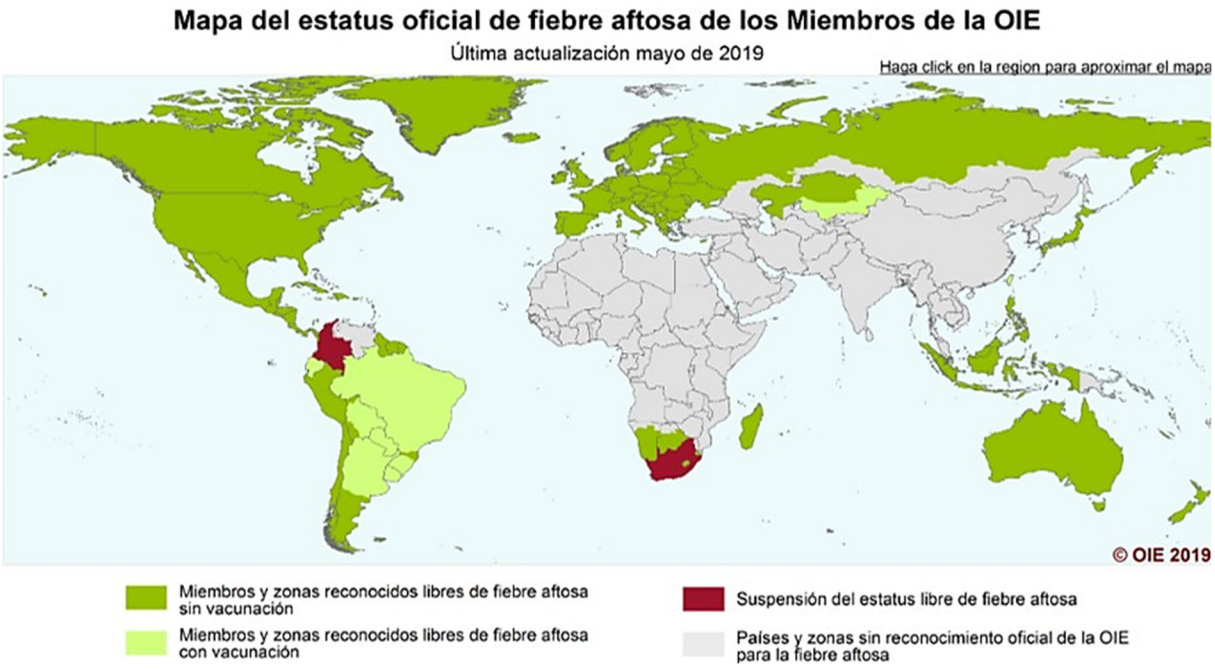

Figura 1-2. Mapa del estado de la fiebre aftosa de los miembros oficial de la OIE. Tomado de: http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/fmd/en-fmd-carte/ (OIE, 2019)

La OIE ha desarrollado recomendaciones de políticas de control tanto para proteger a los países libres de fiebre aftosa como para que los países afectados recuperen el estatus de libres de esta enfermedad. Estas recomendaciones, detalladas en el Código Sanitario para los Animales Terrestres, consisten básicamente en la protección de zonas libres aplicando controles y vigilancia de los desplazamientos de animales en las fronteras. Sumado a ello, en casos de brotes epidémicos, se realiza el sacrificio de animales infectados y susceptibles al contagio; la incineración de los cadáveres y productos asociados; y la implementación de medidas cuarentenarias. En el transcurso de brotes epidémicos o en algunas zonas endémicas, a estas medidas se les incorpora la vacunación del rebaño susceptible con vacunas de emergencia que protejan contra la cepa del virus prevaleciente en dicha área (OIE, 2018a). El estatus sanitario, otorgado por la OIE, tiene enorme impacto económico particularmente sobre países exportadores de carne y subproductos, ya que impone restricciones a mercados de productos de origen pecuario. La magnitud de las pérdidas económicas por los brotes de fiebre aftosa ocurridos en el Reino Unido en el 2001 fueron calculadas en U$S 10.800 millones. Dentro del MERCOSUR, países como Argentina, Brasil y Paraguay han obtenido la condición de libre de fiebre aftosa, pero tienen dentro de su territorio zonas libres con y sin vacunación. En lo que respecta a Uruguay, si bien durante la década del 90 la OIE lo declaró país libre de fiebre aftosa sin vacunación, luego del brote del año 2003

pasó a definirse como país libre con vacunación. Las pérdidas asociadas al último brote (año 2001) para Uruguay y Argentina fueron estimadas en U$S 700 a 1.700 millones (Parida, 2009).

1.2.1 | Enfermedad y agente etiológico

La fiebre aftosa es una enfermedad viral altamente trasmisible que afecta a animales con pezuña hendida como el ganado bovino, porcino, ovino y caprino, y a aproximadamente unas 70 especies silvestres. Su gravedad clínica es muy variable y depende de factores como las propiedades inherentes al virus, de la especie hospedero, del *background* genético, y de los antecedentes previos de exposición al virus o vacunación. En bovinos y porcinos, la infección inicial se localiza específicamente en áreas de epitelio que recubre el tejido linfoide asociado a las mucosas naso-faríngea (en bovinos) u oro-faríngea (en porcinos) (Arzt et al., 2010; Stenfeldt et al., 2014). El virus se replica rápidamente, la infección se vuelve sistémica y los signos de enfermedad, que aparecen 2 a 3 días después de la exposición al virus, pueden durar de 7 a 10 días. La enfermedad se caracteriza por secreciones orales y nasales, seguido de la aparición de las típicas lesiones vesiculares en boca, bandas coronarias, hendiduras interdigitales y otras áreas de la piel sin pelo, como el hocico y tetinas. La propagación de la infección entre animales susceptibles es rápida, a través de contacto directo o indirecto por fómites o aerosoles. En los animales jóvenes, la mortalidad es alta debido la miocarditis causada por la infección, mientras que en los adultos la mortalidad es baja pero la morbilidad es alta observándose una debilidad generalizada con pérdida de peso y disminución de la producción de leche. En general, la enfermedad clínica en los animales adultos se resuelve en aproximadamente dos semanas. En particular, ha sido reportado que la fase aguda de la enfermedad es más grave en cerdos que en rumiantes (Alexandersen et al., 2003; Arzt et al., 2011). Además, hay evidencia de cepas de FMDV que son atenuadas para el ganado pero virulentas en cerdos, sugiriendo que las vías moleculares involucradas en la infección son específicas del hospedador (Stenfeldt et al., 2016a). En ovejas y cabras, la enfermedad es generalmente leve y puede ser difícil de distinguir de otras condiciones comunes (Brooksby, 1982; Grubman and Baxt, 2004).

Entre los rumiantes, el control de la fiebre aftosa se complica aún más por la aparición de una infección persistente subclínica comúnmente conocida como el estado "*portador de FMDV*". El estado portador se establece en aquellos animales que continúan eliminando virus infecciosos luego de 28 días post-infección, si bien la divergencia hacia este estado portador ocurriría previo a ese período (Stenfeldt et al., 2016b). Los mecanismos que median la persistencia del FMDV en la mucosa nasofaríngea aún no han sido dilucidados, se ha sugerido que son el resultado de la interacción dinámica entre el huésped y el virus en el sitio de la persistencia (Arzt et al., 2019; Pacheco et al., 2015; Stenfeldt et al., 2016b). La duración del estado portador puede variar de meses a años, según el contexto epidemiológico. El papel de los animales

portadores en la evolución y ecología del virus sigue siendo controvertido, dado que aún no se ha demostrado experimentalmente la transmisión del virus desde el ganado portador a animales naïve susceptibles. Sin embargo, en estudios a campo, se ha relacionado al ganado portador con surgimiento de brotes, y recientemente se demostró que el líquido orofaríngeo recolectado de los portadores es infeccioso para el ganado naïve (Arzt et al., 2018; Biswal et al., 2019). La vacunación no protege contra el estado portador y los animales vacunados a menudo experimentan infecciones subclínicas (Arzt et al., 2011; Pacheco et al., 2015; Stenfeldt et al., 2016b). A diferencia de los rumiantes, los cerdos son más eficientes en eliminar completamente la infección, y no presentan el estado *"portador de FMDV"* (Stenfeldt et al., 2016c).

El agente etiológico de la fiebre aftosa es un virión de 140S perteneciente al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*, con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo encapsidado en una partícula icosaédrica no envuelta. El genoma viral es de aproximadamente 8500 nucleótidos, y presenta un largo marco de lectura abierta (ORF) que codifica para cuatro proteínas estructurales, VP1 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C) y VP4 (1D), y varias proteínas no estructurales (NSP), L^{pro}, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, $3C^{pro}$ y $3D^{pol}$, que participan principalmente en la replicación del virus y modulan la respuesta inmune del hospedero. Flanqueando el ORF, el extremo 5′-UTR del ARN viral está unido covalentemente a la proteína viral (VPg) y el 3′-UTR está poliadenilado. Ambas regiones desempeñan múltiples funciones en la replicación y traducción de la poliproteína viral (Figura 1-3A) (Grubman and Baxt, 2004).

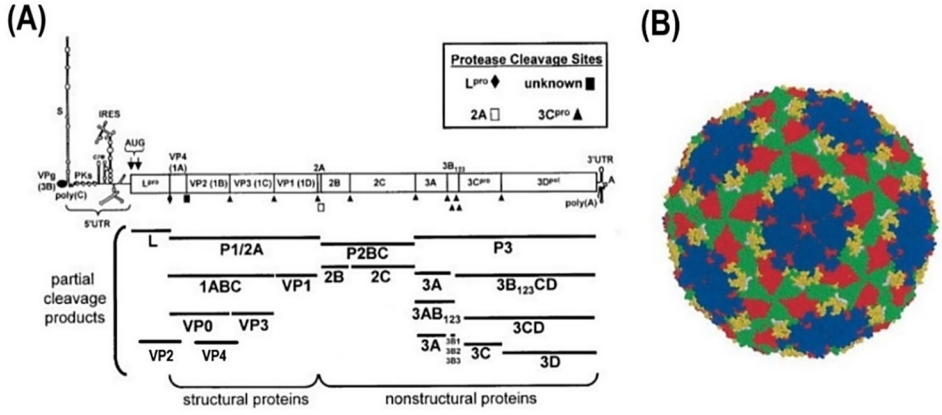

Figura 1-3. Esquema del virus de la fiebre aftosa. En (A) se muestra el mapa del genoma. En (B) se muestra la estructura del virión de la fiebre aftosa O1 maduro basada en datos cristalográficos de rayos X. Las proteínas virales se representan con color: azul es VP1, verde es VP2 y roja es VP3. VP4 se ubica dentro de la partícula. Las figuras fueron tomadas y adaptadas de Grubman and Baxt, 2004.

Por microscopía electrónica, el virión es una partícula redondeada con una superficie lisa y un diámetro de aproximadamente 25 nm. La cápside está compuesta por 60 copias de las 4 proteínas estructurales, una copia de cada una de estas proteínas forma un protómero; 5 protómeros se ensamblan en un pentámero; y 12 pentámeros forman la cápside icosaédrica

completa (Fig. 1-3B). VP1, VP2 y VP3 están en el extremo distal, y VP4 está completamente dentro de la cápside. VP1 forma un bucle que sobresale de la superficie y contiene una secuencia altamente conservada de arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp, RGD). Esta secuencia es un importante sitio de neutralización del FMDV debido a que es fundamental para la internalización del virus mediante la interacción con los receptores de integrina en la membrana celular del hospedero (Wang et al., 2015).

El FMDV es antigénicamente variable, donde además de los siete serotipos inmunológicamente distintos: A, O, C, Asia 1, SAT (del inglés; *South AfricanTerritories*) 1, 2 y 3; muestra múltiples subtipos (Grubman and Baxt, 2004). La distribución de los serotipos de FMDV en regiones endémicas no es uniforme, en África han sido encontrados seis de los siete serotipos (O, A, C y SAT 1-3), en países asiáticos han sido reportados solo cuatro serotipos (O, A, C y Asia-1), mientras que en América del Sur solo circulan los serotipos O, A y C (de los Santos et al., 2018). Recientemente, se reportó que el serotipo C habría dejado de circular a nivel mundial dado que desde el año 2004 no se han registrado brotes asociados a él (Knight-Jones et al., 2016b). Por otra parte, FMDV es capaz de generar cuasiespecies durante las infecciones debido a la alta tasa de mutación y de replicación. En general, las cuasiespecies virales tienen un enorme potencial para evolucionar rápidamente y adaptarse a nuevos entornos, así en FMDV las principales variaciones antigénicas reportadas son observadas dentro de la región codificadora de las proteínas estructurales. A nivel de las proteínas NS se sugiere que las mutaciones son menos toleradas, debido a que son necesarias para la replicación viral y probablemente la variación antigénica sea letal (Abubakar et al., 2018).

El ciclo del virus de la FMDV se divide en varias fases: unión, internalización, desnudamiento, traducción, replicación, encapsidación y liberación (Fig. 1-4). El FMDV inicia la infección mediante la

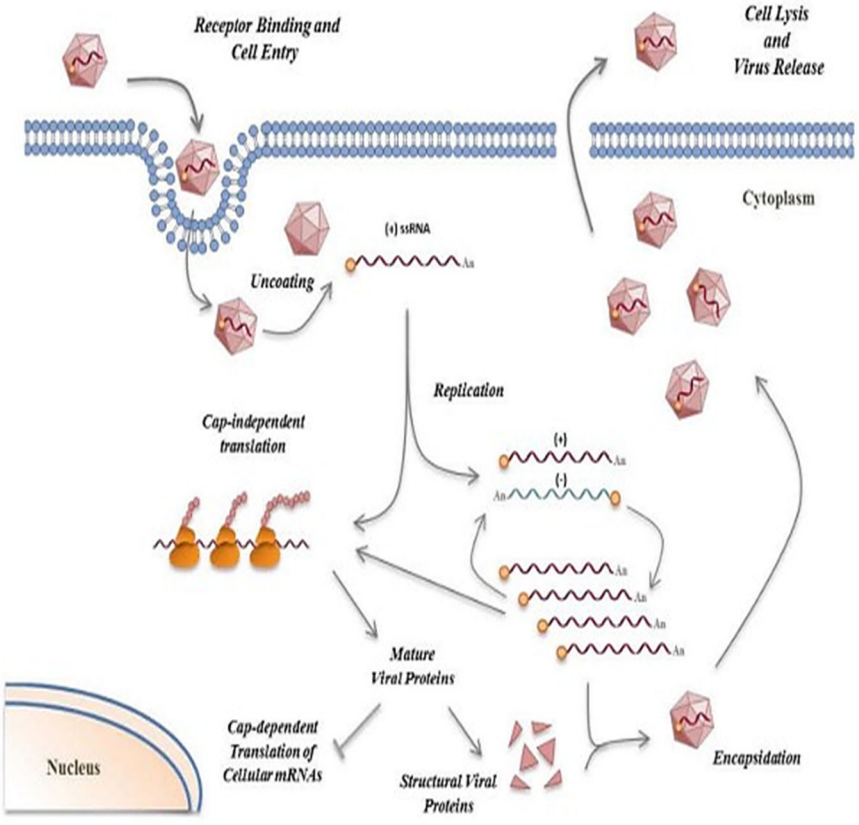

Figura 1-4. Esquema del ciclo de vida del virus de la fiebre aftosa. Tomado de Rodríguez Pulido and Sáiz, 2017

unión del motivo RGD (Arg-Gly-Asp), altamente conservado en VP1, a las integrinas αvβ1, αvβ3, αvβ6, and αvβ8 del hospedero. En bovinos, el virus se une principalmente a las integrinas αvβ6 que son altamente expresadas en células epiteliales (O'Donnell et al., 2009). Además, ha sido reportado que FMDV, *in vitro*, puede utilizar otros receptores para internalizarse como el heparan sulfato (HS) y la proteína JMJD6 (Lawrence and Rieder, 2017; Medina et al., 2018; Wang et al., 2015). Tras la unión del virus al receptor, se induce su internalización a través de vesículas recubiertas de clatrina (vía integrinas) o mecanismos mediados por caveola (vía Heparan Sulfato)(Lawrence and Rieder, 2017). La acidificación de los endosomas desencadena el *desnudamiento* viral, donde el virión 140S se escinde a subunidades de 12S liberando el ARN viral al citosol. El FMDV bloquea eficazmente la traducción del hospedador mediante el clivaje, dependiente de L^{pro}, del factor de iniciación de la traducción F4G, y la *traducción* comienza en el elemento IRES. La *replicación* de ARN unido a VPg se lleva a cabo mediante una ARN polimerasa llamada $3D^{pol}$ la cual transcribe el ARN de sentido positivo en una molécula de ARN complementaria de sentido negativo. Luego, $3D^{pol}$ genera múltiples ARN de sentido positivo que entran en una nueva ronda de traducción y replicación de ARN, o son empaquetados por las proteínas de la cápside para formar nuevas partículas de virus que finalmente se liberan por lisis celular (Rodríguez Pulido and Sáiz, 2017). Por último, se requiere la *encapsidación* del ARN genómico viral y la maduración de la cápside. En esta etapa, la proteína intermedia VP0 se procesa en VP2 y VP4 por un mecanismo desconocido. Finalmente, la célula infectada se lisa y se produce la *liberación* de las nuevas partículas virales (Medina et al., 2018).

1.2.2 | Respuesta inmune contra FMDV

1.2.2.1 | *Inducción de la respuesta inmune innata durante la infección*

Una vez que el virus ingresa a las células epiteliales y comienza a amplificar su genoma, los mecanismos de defensa del hospedero desencadenan una respuesta local de IFNs tipo I y III, resultando en la secreción autócrina de IFNs y de otras citoquinas, que a su vez inducen la expresión de ISG (del inglés: *IFN-stimulated gene*) en los tejidos vecinos y distales. Cuando la respuesta local no puede restringir la replicación del virus, y este se disemina vía el torrente sanguíneo, se monta una robusta respuesta de IFNs. En general, las infecciones virales agudas se resuelven en 1 a 2 semanas, pero en algunos casos pueden volverse persistentes y reaparecer cuando las condiciones son favorables (Medina et al., 2018).

El reconocimiento del patógeno es primordial dado que un hospedero solo puede iniciar una respuesta inmune antiviral una vez que lo ha detectado. En este sentido, varios estudios han reportado que diferentes PAMPs (del inglés: *Pathogen Associated Molecular Patterns*) de FMDV son reconocidos por diferentes PRRs (del inglés: *Pathogen Recognition Receptors*):

TLR4 durante la fase aguda de la infección en el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) de bovinos (Zhang et al., 2006); TLR7/8, en células NK (del inglés: *Natural Killer*) porcinas (Toka et al., 2009c); TLR7 en pDC (del inglés: *Dendritic Cell*; p: plasmocitoides) (Lannes et al., 2012); TLR9 en pDC y células B (Alves et al., 2009). Zhang y colaboradores reportaron que durante la fase aguda de la infección en bovinos no aumenta la expresión de TLR3, que reconoce ARNds (ARN de doble cadena), molécula intermediaria de la replicación de virus ARN, sin embargo, aumenta la expresión de TLR4. Este aumento de la expresión del TLR4, posiblemente indicaría un papel en la inducción de la expresión de los ARNm de IFN tipo I en respuesta a la infección por FMDV (Zhang et al., 2006). Además, el FMDV es detectado por MDA5 pero no por RIG-I o TLR3 en células epiteliales porcinas (Hüsser et al., 2011) (Fig. 1-5).

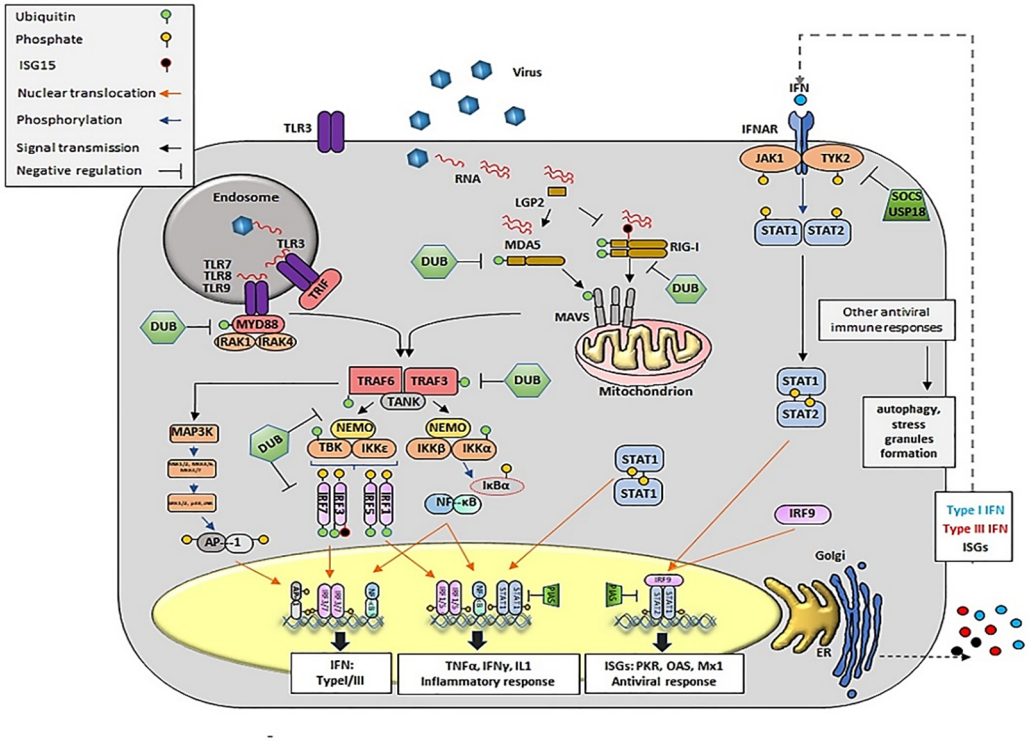

Figura 1-5. Respuestas inmunes innatas durante la infección viral. Tras la infección viral, su ARN viral es detectado mediante PRRs como los RLR citosólicos (RIG-I, MDA-5 o LGP2) y/o TLRs que se encuentran unidos a la membrana, desencadenando una cascada de transducción de señales que culmina en la transcripción de moléculas innatas, incluyendo IFN, citoquinas pro-inflamatorias y ISGs. Tomado de Medina et al., 2018.

Las infecciones virales pueden estimular múltiples vías para inducir IFNs tipo I y tipo III, los cuales tienen funciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras (Fensterl et al., 2015). Los IFNs tipo I promueven la maduración de las DC e influyen en la eficacia de las respuestas inmunes adaptativas. Los IFN-α/β (tipo I) pueden ser producidos por prácticamente todos los tipos de células nucleadas. En la mayoría de los casos, los IFN tipo I y tipo III parecen estar coproducidos en respuesta a la infección viral, con mecanismos similares de inducción, transducción de señales y actividades biológicas (Rodríguez Pulido and Sáiz, 2017). Los IFNs orquestan respuestas antivirales en células infectadas que se amplifican y se propagan a células no infectadas circundantes y a células inmunes como las NK, las APC (del inglés:

Antigen Presenting Cell) y los ILC (del inglés: *Immune Lymphoid Cell*). La activación de la señal de IFNs comienza extracelularmente con la unión al receptor de IFNs (IFNAR1/2), lo que provoca la activación de TYK2 y JAK1, dando como resultado la fosforilación, dimerización y translocación nuclear de los factores de transcripción STAT1 y STAT2. Los heterodímeros STAT1/STAT2 pueden unirse al IRF9 para formar el complejo ISGF3 que a su vez se une al ADN para activar la transcripción de genes estimulados por IFNs (ISG) (Medina et al., 2018) (Fig. 1-5). Los productos codificados por ISG conjuntamente median los efectos antivirales como la degradación del ácido nucleico viral o la inhibición de la expresión de genes virales (Rodríguez Pulido and Sáiz, 2017).

Existe un fuerte consenso entre los trabajos publicados que indican el surgimiento de una importante actividad sistémica de IFN tipo I y/o tipo III concomitantemente con el inicio de la viremia durante la fase clínica aguda y fulminante en bovinos infectados con FMDV, pero no vacunados (Arzt et al., 2014; Eschbaumer et al., 2016; Perez-Martin et al., 2012; Stenfeldt et al., 2011; Windsor et al., 2011). La correlación en la aparición de la viremia en la sangre y la activación antiviral sistémica, se ve respaldada por el hallazgo de que el ganado vacunado y protegido por lo general no tiene viremia y carece de la activación sistémica de IFNs que ocurre en bovinos naïve (Eschbaumer et al., 2016). Sin embargo, se desconoce la fuente de IFNs sistémico en el ganado, aunque se sugiriere que podrían ser las pDC (Reid et al., 2011), o la inducción de factores inflamatorios y antivirales en sitios de lesiones con abundante amplificación viral (Arzt et al., 2014; Stenfeldt et al., 2011; Zhang et al., 2009).

El FMDV comienza su interacción con el hospedero con la infección de células epiteliales de la mucosa nasofaríngea en bovinos o un epitelio similar dentro de las criptas de las amígdalas orofaríngeas en cerdos. Posteriormente, el virus puede entrar en contacto con las células NK, T$\gamma\delta$ o APCs. Esta interacción puede darse como resultado de diferentes situaciones como ser la infección lítica de las células epiteliales y la posterior fagocitosis y/o la acción lítica sobre los tejidos dañados a causa de la infección. Además, las células como DCs o macrófagos (Mφ) pueden infectarse a través de la internalización directa o por un proceso de internalización mediado por anticuerpos, lo que facilita el contacto celular durante la infección [revisado en (Medina et al., 2018)]. En la Figura 1-6 se esquematizan las interacciones entre el FMDV y la respuesta innata.

Las células NK murinas son las principales poblaciones responsables de la eliminación de las células infectadas por virus. Además, evitan la diseminación del patógeno en el hospedero mediante la producción de citoquinas antivirales como el IFN-γ (Patch et al., 2014). Sin embargo, poco se conoce sobre su rol en la infección con FMDV en animales grandes. En particular, ha sido reportado que células NK aisladas de bovinos infectados con FMDV tienen, *in vitro*, un alto nivel de citotoxicidad contra las células bovinas infectadas. Sin embargo, presentan una baja citotoxicidad contra las células bovinas no infectadas (Toka and Golde,

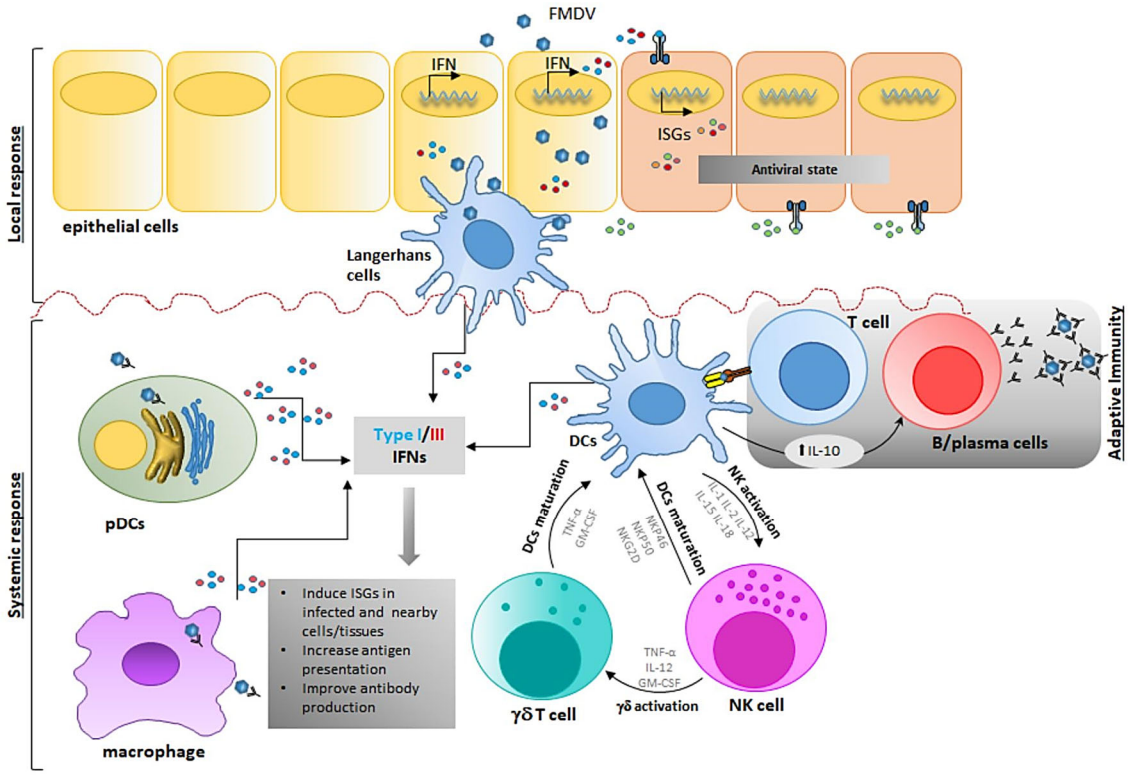

Figura 1-6.FMDV modula las primeras etapas de la respuesta inmune *in vivo*. En esta figura se representa un esquema de las posibles interacciones de las células DC, NK y T γδ de la respuesta innata al FMDV, aunque la interacción aún resta por comprenderse. Tras la infección por FMDV y la primera ronda de replicación en las células epiteliales, el virus entra en contacto con las células de la respuesta innata. Las DC, pDC y Mϕ producen IFNs y otras citoquinas que modulan la respuesta inmune. Después de la infección y la replicación de FMDV, se detecta la IL-10 sistémica producida por los cDC, lo que dirige la respuesta adaptativa hacia el brazo humoral más que a una respuesta mediada por células T. Tomado de Medina et al., 2018.

2013). En cerdos, ha sido reportado que las NK aisladas de animales infectados con FMDV serían disfuncionales (no producen IFN-γ y no exhiben citotoxicidad) debido a la naturaleza supresora de la infección por virus *in vivo* (Toka et al., 2009a). Además, demostraron ser mínimamente citotóxicas, incluso contra las células infectadas con FMDV. Sin embargo, la estimulación *in vitro* con las citoquinas IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 o IFN-α, aumenta significativamente su citotoxicidad. Este estado de las células impediría su papel protector en la fase temprana de la infección de cerdos con FMDV (Toka et al., 2009b).

Las células Tγδ constituyen una de las poblaciones linfocitarias más importante en rumiantes a nivel de sangre periférica, tejidos epiteliales y sitios de inflamación. Las células T que expresan receptores de células Tγδ (TCR) representan del 20 al 50% de las células T circulantes en rumiantes jóvenes y cerdos, sugiriendo un papel importante en la defensa del hospedero. Se sabe que el ganado tiene subpoblaciones de células Tγδ, siendo el principal antígeno de diferenciación una molécula de superficie de 215 kDa denominada *Workshop Cluster 1* (WC1), que se expresa en la mayoría de las células Tγδ de sangre periférica de bovinos. Las subpoblaciones de las Tγδ WC1 difieren en el fenotipo celular, en la distribución en los tejidos, y en las funciones, pudiendo tener un perfil pro-inflamatorio, inmunomodulador, tener actividad

citotóxica, o actuar como célula presentadora de antígenos (Guerra-Maupome et al., 2019). En bovinos, ha sido reportado que las células Tγδ WC1$^+$ estarían involucradas en la respuesta innata contra la infección con FMDV. La células T γδ WC1$^+$ de sangre periférica regularían positivamente la activación de las células T, e inducirían directamente la proliferación de células T CD4$^+$ después de la infección por FMDV (Guerra-Maupome et al., 2019). La depleción *in vivo* de las células Tγδ WC1$^+$ en el ganado después de la infección con FMDV, da como resultado un período más corto de viremia (5 días) en comparación con los resultados de la depleción de las células T CD4$^+$ o CD8$^+$ donde la viremia es de 6 o 7 días, respectivamente (Juleff et al., 2009). Sin embargo, más allá de estos resultados es necesario avanzar y profundizar en el rol de estas células dentro de la inmunidad de bovinos y en el contexto de la fiebre aftosa.

Las células dendríticas, y principalmente las células dendríticas plamocitoides (pDC), juegan un papel crucial en el control de infecciones virales, especialmente en respuesta a virus que han desarrollado mecanismos para bloquear la vía de transducción de señales de IFN tipo I (IFN-α e IFN-β), principales citoquinas antivirales. Reid y colaboradores han detectado en el ganado una población de pDC capaz de producir altos niveles de IFN tipo I, en respuesta a CpG, agonista de TLR9, y a complejos inmunes con FMDV (Reid et al., 2011). Sin embargo, las interacciones de estas células con cápsides vacías FMDV o el virión FMDV inactivado no produjeron IFN tipo I. Estos hallazgos indicarían que los pDC desempeñan un papel crucial en proporcionar inmunidad protectora en animales previamente vacunados, ya que la producción de IFN tipo I depende de la existencia de complejos de anticuerpos de virus en experimentos *in vivo*. La función del IFN tipo I en las etapas iniciales de la infección no está definida ya que no se observó ningún efecto sobre la enfermedad clínica durante la depleción de las células CD4$^+$ productoras de IFN tipo I [revisado en (Abubakar et al., 2018)].

En general, se considera que la capacidad de FMDV para replicarse con éxito en la célula hospedera está sujeta a la supresión efectiva de la inmunidad innata. El contraataque del virus a la respuesta del hospedero es realizado tanto por las proteínas codificadas como por las regiones no transcriptas del genoma de FMDV. En particular, se ha descrito a la proteína L^{pro} como una "*proteína de seguridad*" para garantizar la supervivencia del virus (Agol and Gmyl, 2010; Medina et al., 2018).

1.2.2.2 | *Respuesta humoral*

La defensa inmune contra la fiebre aftosa se ha correlacionado con una respuesta inmune mediada por anticuerpos, la cual es considerada como el principal factor en conferir protección contra la fiebre aftosa. Esta respuesta humoral, principalmente de anticuerpos neutralizantes, ha sido bien estudiada en animales infectados y vacunados, y está caracterizada por ser serotipo-específica (Brehm et al., 2008; Grubman and Baxt, 2004; McCullough et al., 1992).

Los estudios que intentan avanzar en el conocimiento de la respuesta de las células B productoras de anticuerpos específicos de FMDV son escasos. En particular, Pega y colaboradores demostraron que bovinos cursando la fase aguda de la infección experimental con FMDV producen células secretoras de anticuerpos (ASC) específicas. Estas células FMDV-ASC aparecen en los órganos linfoides de todos los animales al día 4 después de la infección, aumentando su presencia, principalmente en los órganos de las vías respiratorias superiores, hacia los días 5 a 6 días después de la infección. A los 5 días después de la infección se reportó un predominio del isotipo IgM que se corresponde con la disminución en la detección de ARN viral en sangre periférica (Pega et al., 2013).

La respuesta de anticuerpos es rápidamente acompañada con la eliminación de complejos virus-anticuerpo por medio de células fagocíticas. En etapas muy tempranas de la infección, a los 3-4 días se detectan en suero altos títulos de IgM neutralizantes que alcanzan el pico de concentración aproximadamente 10-14 días después de la infección y luego disminuye (Parida, 2009; Waheed et al., 2008). Aproximadamente, entre los 4-7 días después de la infección se detecta IgG, quien se convierte en el principal anticuerpo neutralizante a las 2 semanas después de la inmunización (Sobrino et al., 2001). Asimismo, se reporta que el título de IgG1 es mayor que el de IgG2 tanto en animales vacunados como infectados. En las mucosas de los animales infectados se produce inicialmente un aumento de IgM, seguido de un incremento de los anticuerpos de IgG e IgA secretoria [revisado en (Parida, 2009)]. Sin embargo, Parida y colaboradores reportaron que cuando el animal, vacunado o infectado naturalmente, se convierte en portador del virus, la replicación a nivel orofaríngea actuaría como un estímulo constante para producir una mayor cantidad de IgA secretoria (Parida et al., 2006a).

Aunque el FMDV provoca una rápida respuesta de anticuerpos neutralizantes tanto en animales infectados naturalmente como vacunados, ésta es ligeramente más rápida durante la infección natural. En este sentido, animales con títulos de anticuerpos similares pueden diferir en su capacidad de responder a la infección por FMDV. De hecho, animales con título bajo de anticuerpos neutralizantes pueden controlar la infección, mientras que algunos animales con títulos aceptables de anticuerpos neutralizantes son susceptibles a la infección por FMDV (McCullough et al., 1992; Oh et al., 2012; Sobrino et al., 2001).

Al comparar la protección en el tiempo, muchos estudios, realizados con diferentes serotipos y adyuvantes, han demostrado que la vacunación contra fiebre aftosa genera una inmunidad a corto plazo (El-Sayed et al., 2012; Mahapatra and Parida, 2018). Por el contrario, la protección en animales infectados naturalmente es a largo plazo, alcanzando incluso algunos años (Alexandersen et al., 2003). En este sentido, Julleff y colaboradores sugirieron que el mantenimiento de la respuesta de anticuerpos a largo plazo en animales infectados se debería a la persistencia del antígeno FMDV, en particular de las proteínas estructurales, en las células dendríticas foliculares en el centro germinal del ganglio linfático mandibular (Juleff et al., 2008).

1.2.2.3 | *Desarrollo de inmunidad celular*

Durante la fase temprana de la respuesta contra la infección de FMDV, hay una supresión transitoria pero generalizada de las respuestas timo-dependientes. Se ha sugerido que este efecto podría ser mediado por la regulación negativa de la expresión de las moléculas MHC II y CD40 en las DC. En cerdos, se ha visto que durante la fase de viremia (1-2 días post infección) las poblaciones de células T y B encuentran disminuidas, y las funciones de las células T alteradas. Ambas poblaciones son restablecidas a valores normales cuando la viremia disminuye a los 4-7 días post-infección. Aún no están claros los mecanismos por los cuales el virus induce esta linfopenia y la alteración de las funciones de las células T (Abubakar et al., 2018). Contrariamente, la administración de FMDV inactivado induce una respuesta típica de anticuerpos, aunque su inducción se vio retrasada aproximadamente una semana (Ostrowski et al., 2007).

El desarrollo de la respuesta células T durante la infección con FMDV aún no está bien entendido, dado que existe un fuerte consenso entre los trabajos publicados que indican un dominio de las respuestas de anticuerpos T-independientes durante la infección temprana por el virus de la fiebre aftosa. Las células B pueden inducir una respuesta, sin la colaboración de las células T, por antígenos tipo II T-independientes (TI-2), como lo son las cápsides virales, que tienen epítopes repetitivos regulares dentro de su estructura (Grant et al., 2016). Ostrowski y colaboradores han investigado los mecanismos inmunes que conducen a la respuesta rápida y protectora de anticuerpos T-independiente en ratones. Estos investigadores demostraron *in vitro* que las DC derivadas de médula ósea infectadas con FMDV pueden estimular directamente las células B de la zona marginal del bazo (llamadas células B innatas $CD9^{+}$) para secretar IgM anti-FMDV, en un proceso dependiente de IL-6 derivada de DCs y de IL-10 derivada de células B, pero independiente de las células T. Sin embargo, se requirió de la colaboración células T para inducir el cambio de clase a diferentes isotipos de IgG, un aumento en los títulos de anticuerpos neutralizantes, y para generar respuestas de IgG de larga duración luego de la infección (Ostrowski et al., 2007). Además, se ha informado que otras infecciones virales citopáticas agudas en ratones hay una dependencia similar de células T, por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular, donde la producción de anticuerpos IgG neutralizantes depende de las células T, mientras que la infección temprana se caracteriza por una IgM neutralizante rápida independiente de T respuesta [revisado en (Habiela et al., 2014)]. Los bovinos no desarrollaron respuestas significativas de células T específicas contra FMDV durante la resolución de la infección aguda y hasta 19 días post-infección (Windsor et al., 2011). Por otra parte, se ha informado que la respuesta proliferativa de células T bovinas específicas para FMDV aumenta luego del día 28 post-infección, una respuesta atribuida al estado del portador y la presencia de virus persistente en rumiantes (Habiela et al., 2014).

La interrogante que surge es si las respuestas de anticuerpos T-dependientes no se inducen o si lo hacen y posteriormente se inhiben. En este sentido se plantean dos posibilidades, una es la que surge a partir de estudios en ratones que muestran que la producción temprana de IFN tipo I (IFN-α), durante la infección, sería la responsable de la disminución de la proliferación y de la inhibición de funciones de las células T. La otra posibilidad es que los virus químicamente inactivados podrían inducir una respuesta reguladora de las células T (Langellotti et al., 2012; Reid et al., 2011). En el ganado bovino, se detectan niveles bajos de IFNs Tipo I (Windsor et al., 2011) por lo que se sugiere que frente a la infección con FMDV, montan un perfil inmunosupresor mediado por células T$\gamma\delta$. Las T$\gamma\delta$ bovinas demostraron tener la capacidad de impedir significativamente la proliferación *in vitro* de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ específicas de FMDV (Guzman et al., 2014); y su depleción parcial redujo el período de viremia de la infección por FMDV en el ganado (Juleff et al., 2009). La segunda posibilidad se centra en las interacciones de las DC, dado que en ratones, se sugiere que el FMDV induciría la depleción de las DC esplénicas (Langellotti et al., 2012). En bovinos, las células DC derivadas de monocitos infectadas con FMDV mueren a causa de los complejos inmunes formados por el FMDV y los anticuerpos del hospedero, representado una posible estrategia de evasión inmune (Robinson et al., 2016).

La muerte de las células DC bovinas infectadas con FMDV lleva a una falta de estimulación de la proliferación de células T (Robinson et al., 2011). A diferencia de lo reportado en ratón y cerdos, en bovinos no se observa linfopenia y ni supresión de las respuestas proliferativas de las PBMC al mitógeno o al antígeno de terceros (Windsor et al., 2011), como así tampoco expresan altos títulos de IFN-α e IL-10 (Reid et al., 2011; Windsor et al., 2011). La ausencia de leucopenia y la inmunosupresión generalizada también pueden estar asociadas con los niveles comparativamente bajos de IFNs tipo I e IL-10 durante la infección aguda en bovinos. Por otra parte, en cerdos se reportó que los altos niveles de estas citoquinas durante la infección aguda podrían explicar los signos clínicos más graves generalmente descritos después de la infección por este virus (Alexandersen et al., 2003).

Por otra parte, existe otra corriente que sugiere que las respuestas de células T $CD4^+$ serían necesarias para la inmunidad protectiva al participar en la producción de anticuerpos antivirales, dado que han identificado y caracterizado epítopes de células T colaboradoras (Th: del inglés *T helper*) en proteínas de la cápside y en las NSP de FMDV (Collen and Doel, 1990; Parida, 2009; Sobrino et al., 2001). Además, ha sido propuesto que las cápsides de FMDV estarían compuestas de epítopes T-dependientes y T-independientes de células B (Carr et al., 2013). Se ha mostrado que células T $CD4^+$ restringidas a MHC clase II responden al antígeno presentado por APCs produciendo respuestas Th1 (IFN-γ) y Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Golde et al., 2008). Parida y colaboradores demostraron una correlación positiva entre la producción de

IFN-γ y la protección clínica inducida por la vacuna en bovinos al día del desafío, siendo la principal fuente de esta citoquina las células T $CD4^+$ (Parida et al., 2006b).

Más allá, del limitado conocimiento del rol de la respuesta T $CD4^+$ en la protección frente a la infección, se adjudica un rol importante al IFN-γ en la actividad antiviral contra FMDV, que es producido principalmente por células T $CD4^+$. Su rol estaría dado por la activación de células natural killer (NK) y macrófagos, que contribuirían a controlar la replicación y propagación de FMDV en el hospedero (Moraes et al., 2007; Summerfield et al., 2009; Zhang et al., 2002; Parida et al., 2006b). Por otra parte, diferentes publicaciones han relacionado la producción de IFN-γ bovino con la respuesta innata y antiviral *in viv*o contra FMDV (Toka et al., 2011; Zhang et al., 2009, 2006) e *in vitro* (Zhang et al., 2002). Además, en cerdos se ha relacionado al IFN-γcon propiedades antivirales conjuntamente con IFNs tipo I (Diaz-SanSegundo et al., 2010; Moraes et al., 2007). Sin embargo, en rumiantes los mayores esfuerzos se han enfocado en utilizar al IFN-γ como un indicador de inmunidad adaptativa inducida por infección o vacunación (Carr et al., 2013; Oh et al., 2012; Parida et al., 2006b).

Las respuestas exitosas contra muchos virus dependen de las células T $CD8^+$, en particular para FMDV han sido reportadas (Blanco et al., 2001; Childerstone et al., 1999; Pandya et al., 2015; Patch et al., 2013) pero su papel en la inmunidad protectiva contra el FMDV sigue siendo tema de estudio (Golde et al., 2008). Estudios realizados con otros miembros de la familia *Picornaviridae* han sugerido que éstos son capaces de disrumpir la vía de presentación de antígenos MHC de clase I de linfocitos T citotóxicos (CTL) (Grubman et al., 2008). Además, se determinó que células T $CD8^+$ citotóxicas producen IFN-γ en respuesta a antígenos virales específicos lo que sugiere un rol importante en la infección con FMDV (Guzman et al., 2008). Además, se ha demostrado que cerdos infectados con FMDV A24 inducen respuestas específicas de $CD8^+$ (Patch et al., 2013). En el modelo de ratón, Langellotti et al. mostraron que la internalización de FMDV *in vivo* por DC activa los componentes de la vía intrínseca de la apoptosis y promueve la presentación de péptidos virales por parte del MHC I, lo que apoyaría la inducción de una respuesta de células T $CD8^+$, mientras que el FMDV inactivado no estimuló esta respuesta (Langellotti et al., 2015).

En resumen, es probable que las células T $CD4^+$ cumplan un papel facilitador importante en el mantenimiento y control de las respuestas inmunes protectivas contra el FMDV. Sin la participación de células T $CD4^+$, las células B experimentan el cambio de isotipo para generar anticuerpos de alta afinidad, la actividad microbicida de los macrófagos se reduce, la eficiencia de las respuestas de células T $CD8^+$ y la memoria de células T $CD8^+$ se ven comprometidas, y la regulación negativa de las respuestas efectoras se ve afectada (Wilk and Mills, 2018).

1.2.3 | Vacunas contra la Fiebre Aftosa

1.2.3.1 | *Generalidades*

El virus de la fiebre aftosa fue el primer virus animal descrito como agente etiológico por Loeffler y Frosch en 1897. Las vacunas contra fiebre aftosa se encuentran entre las primeras vacunas para animales desarrolladas, registrándose los primeros esfuerzos para inmunizar por exposición al virus hacia fines del siglo XIX. Pero es en la década de 1950 cuando surge la primera vacuna inactivada a nivel industrial. Posteriormente, fue reemplazado el método de crecimiento de FMDV, e incluidos los adyuvantes oleosos y nuevos procesos de inactivación [revisado en (Rodriguez and Grubman, 2009)].

Las vacunas actuales se elaboran a nivel industrial siguiendo la metodología descripta en el *Manual of Diagnostic Tests and Vacines for Terrestrial Animals* (OIE, 2018a, 2018b), y de acuerdo a los requerimientos regulatorios específicos de las autoridades de cada uno de los países. La manufacturación se realiza en plantas de nivel de seguridad biológica NSB3 que son inspeccionadas regularmente por autoridades sanitarias locales, regionales e internacionales. En las últimas dos décadas, el MERCOSUR ha consolidado la producción industrial de vacunas eficaces y seguras para prevenir y erradicar la fiebre aftosa utilizando plantas y procesos modernos siguiendo normativas de manufactura internacionales.

Las vacunas son convencionales a base de virus completo, que se inactiva con etilenimina binaria, se purifica y concentra. Para la producción del antígeno se utiliza el cultivo en suspensión de células BHK, las cuales son altamente susceptibles a la infección por el virus. La purificación de los antígenos es un punto crítico, dado que se deben eliminar las NSP del virus, para asegurar la no interferencia con las pruebas de diferenciación de animales vacunados de los animales infectados. Dichas pruebas identifican anticuerpos contra las NSP del virus que se producen luego de la infección o de la vacunación con vacunas no purificadas (OIE, 2018a).

Existen múltiples formulaciones de vacunas acuosas u oleosas conteniendo antígenos de uno o varios serotipos. En general, en las vacunas son incluidas cepas de referencia con alta cobertura y cepas de campo, aunque deben ser adaptadas constantemente de manera que contengan las cepas circulantes. Las cepas de FMDV de tipo salvaje necesitan adaptarse al cultivo celular, por lo tanto, se requieren instalaciones de alta contención para minimizar el riesgo de escape de virus durante la fabricación (de los Santos et al., 2018; OIE, 2018a). En América del Sur, las vacunas contienen los serotipos O y A, y la mayoría de los países del Cono Sur, además incluyen el serotipo C. Estas vacunas se han formulado utilizando cepas seleccionadas salvajes adaptadas para su uso, e incluyen O1 / Campos, A24 / Cruzeiro y C3 / Indaial. Estas cepas han proporcionado una cobertura inmunológica satisfactoria cuando se han aplicado en forma sistémica en las campañas de vacunación luego de un brote (Maradei et al., 2011).

El contenido antigénico varía según el serotipo, el fabricante y el propósito, desde vacunas "*estándar*", que están formuladas para contener suficiente antígeno y adyuvante para asegurar que cumplan con el nivel mínimo de potencia requerido (se recomienda tres dosis protectoras del 50% (PD_{50})), hasta de "*alta potencia*", que contienen como mínimo seis dosis PD_{50} (de los Santos et al., 2018; OIE, 2018a).

La inclusión de adyuvantes en preparaciones de antígeno de fiebre aftosa inactivadas es esencial para la protección. En las vacunas destinadas al ganado bovino se pueden usar saponina, gel de hidróxido de aluminio o adyuvantes oleosos (por ejemplo, Montanide). Para su uso en cerdos, se prefieren las emulsiones doblemente emulsionadas con adyuvantes oleosos (OIE, 2018a).

La OIE sugiere que para establecer un nivel satisfactorio de inmunidad, se deberían realizar dos inoculaciones, separadas 2-4 semanas entre sí, seguida por una revacunación cada 4-12 meses. La frecuencia de revacunación dependerá de la situación epidemiológica, del tipo y calidad de la vacuna utilizada. Opcionalmente, si se emplean vacunas con adyuvantes oleosos, los animales deberían recibir dosis a los 4 meses, al año de edad, y después revacunar anualmente. En la medida de lo posible, los fabricantes de vacunas deben demostrar la duración de la inmunidad para su formulación específica encada especie para la que está indicada. En terneros nacidos de vacas vacunadas, se debe retrasar la primera vacunación, pero no más allá de los 4 meses, mientras que los nacidos de vacas no vacunadas, la primera vacuna puede administrarse a la primera semana de edad (OIE, 2018a).

El alto grado de variación antigénica ha dificultado el desarrollo de una vacuna universal que brinde protección contra todos los serotipos del virus, dado que prácticamente no hay protección cruzada entre ellos. Sumado a ello, la vacunación con múltiples serotipos no induce mayor protección que la conferida por cada vacuna monovalente (Mahapatra and Parida, 2018); sin embargo, se ha demostrado que vacunas de alta potencia contra el serotipo A pueden inducir protección incluso contra desafíos heterólogos (Brehm et al., 2008). En los últimos años, se ha plasmado en la bibliografía la necesidad del desarrollo de una nueva vacuna que pueda en principio mejorar alguno de estos puntos arriba mencionados (de los Santos et al., 2018). En este sentido, en los últimos 15 años se vienen realizando múltiples intentos por desarrollar formulaciones que ofrezcan mayor potencia, seguridad, y una cobertura adecuada de las cepas de FMDV circulantes y emergentes. Así es que surgen nuevas estrategias como ser: utilizar las cepas vivas atenuadas sin la secuencia codificante para L^{pro}; utilizar vacunas a DNA; administrar vacunas peptídicas con VP1 diseñado sintéticamente; vacunar con VPLs (del inglés: *virus-like particles*) expresadas en diferentes sistemas como ser *Baculovirus* y diferentes tipos de plantas; y utilizar vectores virales como *Adenonvirus* y *Vaccinia* expresando proteínas de FMDV. En la mayoría de plataformas, se requerirá una inversión económica y científica para transformarlas en productos comerciales. Además, las

plataformas de vacunas con vectores y VLPs requerirán cambios importantes para facilitar las tecnologías de fabricación de vacunas y reducir los costos. Más allá de estos nuevos desarrollos, en esta tesis nos centraremos en la vacuna inactivada que se administra actualmente (de los Santos et al., 2018).

Para el mantenimiento de la salud animal es esencial contar con vacunas confiables, seguras, y efectivas. Para ello, deben realizarse controles de inocuidad, esterilidad, identidad, pureza y seguridad durante el proceso de fabricación de la vacuna, en los productos intermedios, y sobre el producto final. El efecto protector de la vacuna se evalúa en las especies animales de destino mediante las pruebas de eficacia y potencia. La eficacia es solicitada al momento del registro de una nueva formulación, mientras que los datos de las pruebas de potencia, para cada valencia, son solicitados para la liberación de los lotes de producción para su comercialización. La eficacia de una vacuna, al igual que su potencia, puede ser analizada directamente en animales vacunados evaluando la resistencia a la exposición a virus vivos, o indirectamente a través de pruebas *in vitro*. A nivel internacional, ha sido establecido que la prueba estándar para evaluar la eficacia de la vacuna, contra el o los serotipos, es el test de vacunación/desafío en bovinos (prueba directa). En cambio, para las pruebas de potencia los organismos reguladores recomiendan el uso de pruebas indirectas por cuestiones de practicidad y bienestar animal, aunque la prueba estándar es el ensayo de vacunación y desafío al igual que para la eficacia. Las pruebas indirectas, frecuentemente se basan en la titulación de anticuerpos específicos luego de la vacunación, y pueden aplicarse siempre que haya sido validada la correlación con el EPP (porcentaje de protección esperado) en la especie de destino (OIE, 2018a). A continuación, se describen brevemente las pruebas directas (para evaluar la eficacia), e indirectas (para analizar la potencia):

a) Pruebas directas (ensayos de vacunación/desafío)

La eficacia evalúa la inmunidad protectiva inducida por la vacuna contra FMDV mediante el test PD_{50} (dosis protectiva 50%) o el test PPG (del inglés *Protection against Podal Generalization*) (OIE, 2018a).

La prueba PD_{50} consiste en medir la inmunidad protectiva probando la vacuna en grupos de al menos cinco bovinos inoculados con diferentes volúmenes de dosis de vacuna, de modo que la potencia se pueda expresar en términos de dosis protectiva 50% (OIE, 2018a).

El test PPG es considerado como la prueba "*gold standard*" para evaluar la eficacia de estas vacunas. Para su realización, se seleccionan 18 bovinos de año y medio a dos años de edad; similar raza y peso; y con un buen estado general de salud. Estos bovinos no deben haber estado expuestos al virus previamente. Para identificar infecciones pasadas o actuales con algunos de los serotipos, independientemente de si el animal fue vacunado o no, se detectan anticuerpos contra las NSP del FMDV. Previo a la vacunación, los animales puestos en cuarentena, y a continuación son distribuidos al azar en un grupo de 16 animales que reciben

la vacuna y 2 restantes que ofician de testigos. A los 90 días post vacunación (dpv), los 18 bovinos son transportados a los boxes de seguridad y desafiados vía intradermolingual con 10^4 dosis infectivas bovinas (BID_{50}) del virus vivo. Siete días después, se realiza la lectura verificando que los bovinos control presenten lesiones de generalización podal. Los animales vacunados que presenten lesiones podales serán considerados como no protegidos. Una vacuna es aprobada cuando logra proteger a 12 de los 16 animales vacunados e inoculados. Si protege a 10 animales de los 16 vacunados y desafiados, el producto tendrá derecho a repetición de la prueba. Vacunas con menos de 10 animales protegidos a la descarga son rechazadas. Los desafíos se realizan a los 90 dpv por reglamentación, sin embargo para ciertas vacunas experimentales estos ensayos se realizan a 30 dpv (Maradei et al., 2008; OIE, 2018a).

b) Pruebas indirectas (ensayos de vacunación)

La titulación de los anticuerpos específicos contra cada serotipo de FMDV se realiza mediante el inmunoensayo denominado LPB-ELISA (del inglés "*Liquid-phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay*"). El ELISA consta por una "fase líquida" inicial donde se incuba el suero problema con el antígeno (seroneutralización), y una "fase sólida" (placa de ELISA) en donde se detecta el antígeno libre no neutralizado en la mezcla suero-antígeno (OIE, 2018a).

De 30 a 60 dpv (para Argentina son 60 dpv) toman muestras de suero de todos los animales y se determina el nivel de anticuerpos para los serotipos incluidos en la vacuna. La correlación entre el título de anticuerpos y los porcentajes de protección son determinados mediante el parámetro EPP que estima, en función del título de anticuerpos, la probabilidad de que el ganado esté protegido contra el desafío después de una sola dosis de la vacuna. El EPP se define relacionando los títulos de anticuerpos medidos por LPB-ELISA a los 60 dpv con los porcentajes de protección por PPG, del mismo grupo de animales, frente al desafío *in vivo* realizado a 90 dpv. Para cada serotipo se han generado tablas que luego son aplicadas para determinar la potencia de las vacunas (Maradei et al., 2008; OIE, 2018a).

Los bovinos incluidos en la prueba son seleccionados con mismo criterio que para la prueba de PPG, aunque el número de animales varía de acuerdo a las reglamentaciones internacionales o de cada país. Particularmente, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) de Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) recomienda usar 32 bovinos, de los cuales se vacunan 30 (con una dosis de la vacuna) y los dos restantes son mantenidos como testigos. En países como Argentina y Brasil se vacunan 16 y 18 bovinos respectivamente, manteniendo dos animales como control (PANAFTOSA, 2002; SENASA, 2006).

1.2.3.2 | *Inmunidad asociada a la vacunación contra la fiebre aftosa*

Las vacunas actualmente disponibles consisten en preparaciones de virus de diferentes serotipos, purificados e inactivados químicamente, y la respuesta de anticuerpos neutralizantes es considerado el principal factor en conferir protección contra la fiebre aftosa (Grubman and Baxt, 2004). Estas vacunas confieren protección contra la viremia y los síntomas clínicos de la fiebre aftosa durante un corto período de tiempo (4-6 meses), pero no inducen protección universal contra todos los serotipos y cepas de fiebre aftosa, ni previenen el estado "*portador de FMDV*" (Mahapatra and Parida, 2018; Stenfeldt et al., 2016b).

Las vacunas aplicadas, en forma masiva y regularmente durante brotes o en áreas endémicas, han sido extremadamente útiles previniendo la diseminación de los brotes de fiebre aftosa (Parida, 2009). Está reportado que en bovinos, las vacunas montan una respuesta sistémica de IgG, predominantemente de IgG1 (Parida, 2009), mientras a nivel local se detecta muy poca o ninguna IgA (Archetti et al., 1995), y se sugiere que cuando el animal vacunado se convierte en portador del virus, su replicación a nivel local actuaría como un estímulo constante para producir una mayor cantidad de IgA secretoria (Parida et al., 2006a). En este sentido, estudios han demostrado que el virus puede persistir en el epitelio de la faringe en más del 50% de los bovinos expuestos al virus, incluso en animales inmunizados (Mahapatra and Parida, 2018).

En comparación con la respuesta inmune provocada por el virus vivo durante la infección, la complejidad de la respuesta provocada por las vacunas es menor. El FMDV vivo induce respuestas de anticuerpos sistémicos y mucosos potentes y de larga duración debido a su capacidad de replicarse, entregar ARN a los compartimentos endosomales e iniciar respuestas inmunes innatas (Zabel et al., 2013). Mientras que la vacunación contra FMDV genera una inmunidad a corto plazo, y se sugiere que podría deberse a que la vacunación con partículas inactivadas y no replicativas, incluidas en la vacuna, no inducirían una adecuada inmunidad mediada por células. Durante los procesos de purificación del antígeno vacunal se eliminan muchas NSP de FMDV que constituyen epítopes de las células T (Gerner et al., 2007; Mahapatra and Parida, 2018). Los epítopes de células T derivados del NSP 3A podrían inducir la colaboración con las células B para producir anticuerpos anti-FMDV (Parida, 2009).

A diferencia de la infección, la vacunación en bovinos induciría una rápida respuesta de células T $CD4^+$ específicas de FMDV (Carr et al., 2013; Doel, 1996). En ratones han sido informados resultados similares a los observados en bovinos (Ostrowski et al., 2005). En bovinos fue detectada una respuesta de células T $CD8^+$ específicas de antígeno productoras de IFN-γ después de la vacunación (Guzman et al., 2008). Mientras que en ratones se ha demostrado que el FMDV inactivado aumenta los números de $CD8^+$ y de células T reguladoras ($CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$) en el bazo (Langellotti et al., 2012). Por otra parte, la vacunación contra FMDV induciría un mayor número de células T $\gamma\delta$, con un fenotipo similar a células NK, exhibiendo efectos citostáticos contra las células infectadas. Las células T$\gamma\delta$ de terneros vacunados contra

FMDV se localizan en el sitio de infección y la mucosa del paladar [revisado en (Guerra-Maupome et al., 2019)].

Las células T $CD4^+$ son el tipo celular, dentro de la población de PBMC, con mayor índice de proliferación frente estimulación específica con el antígeno de FMDV *in vitro*, mientras que células T $CD8^+$ y $T\gamma\delta$ $WC1^+$ bovinas proliferan pero en menor medida frente al antígeno (Carr et al., 2013; Takamatsu et al., 2006).

La vacunación del ganado contra FMDV resultaría en la circulación de linfocitos B específicos para FMDV, incluidas células B de memoria, que se diferenciaron en ASC poco después del contacto con el virus en los tejidos linfoides secundarios (Pega et al., 2015).

En los últimos años, se ha comenzado a reconsiderar el correlato de protección asociado a las vacunas contra FMDV, que hasta el momento ha sido exclusivamente el título de anticuerpos neutralizantes. Se ha propiciado a incorporar al correlato actual, marcadores de inmunidad de las células T, como la capacidad de proliferación o producción de IFN-γ ambas en respuesta al antígeno de FMDV, que permitan predecir la protección después de la vacunación (Robinson et al., 2016). Si bien, aún no ha dilucidado en su totalidad la relación entre las respuestas de anticuerpos protectores y las respuestas de células T $CD4^+$ específicas; una serie de estudios han reportado la búsqueda de una correlación entre ambos parámetros para proporcionar un correlato más adecuado de la protección de los animales después de la vacunación. En este sentido, algunos estudios han encontraron una correlación positiva entre la respuesta de IFN-γ en sangre entera reestimulada y el título de anticuerpos neutralizantes (Oh et al., 2012; Parida et al., 2006b; Sharma et al., 2018), mientras que otros no han logrado determinar una correlación entre ambos parámetros (Carr et al., 2013). Este tipo de ensayos da un puntapié para incorporar nuevos y más adecuados correlatos de protección de las vacunas de FMDV.

1.3 | *ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES*

1.3.1 | *Clostridium* spp. y las enfermedades clostridiales

Los clostridios son bacterias anaerobias, Gram-positivas, esporuladas y con forma de bastón, que residen principalmente en el medio ambiente. Estas bacterias fermentativas secretan numerosas enzimas hidrolíticas, que degradan una amplia gama de sustratos orgánicos para proporcionar nutrientes y energía necesarios para su crecimiento. Existen más de 200 especies

de *Clostridium*, de las cuales 15 producen potentes toxinas que son responsables de graves enfermedades en humanos y otros animales (Popoff and Bouvet, 2009).

Los clostridios patógenos no son bacterias invasoras, pero secretan toxinas que actúan a distancia y causan los síntomas y lesiones de las enfermedades clostridiales. Los clostridios pueden ingresar a un organismo por dos rutas: vía oral o una herida. En particular, la ruta oral permite su crecimiento y producción de toxinas en algunos compartimentos del tracto digestivo, lo que lleva a la aparición de enfermedades intestinales o transmitidas por los alimentos. En el caso del botulismo, la toxina preformada en los alimentos es suficiente para causar la enfermedad. La segunda posibilidad es la entrada de clostridios por el tegumento a través de una herida, lo que permite el crecimiento bacteriano anaeróbico en tejidos necróticos. La producción local de toxinas genera gangrena o induce una enfermedad neurológica específica, como en el caso de tétanos (Popoff and Bouvet, 2009).

Las toxinas clostridiales incluyen una gran variedad de proteínas que difieren en su tamaño, estructura, capacidad de difundirse en el organismo, y en su sitio y mecanismo de acción. Algunas toxinas actúan localmente, mientras que otras pueden pasar a través de la mucosa y diseminarse a varios tejidos por la circulación sanguínea. Las toxinas pueden interactuar con diferentes tipos celulares (principalmente las que están involucradas en el desarrollo de gangrenas); o sobre células específicas, como las células intestinales (que conducen a enteritis, enterocolitis necrótica y/o hemorrágica), o ser específicas de neuronas (causantes de trastornos neurológicos como botulismo y tétanos). Las toxinas pueden dividirse según su mecanismo de acción en: toxinas que actúan en la membrana celular (formadoras de poros y con actividad de fosfolipasa), y toxinas que ingresan a las células e interactúan con un objetivo intracelular como los monómeros de actina, pequeñas GTPasas, o proteínas de la maquinaria de exocitosis (Popoff and Bouvet, 2009).

Las enfermedades clostridiales pueden dividirse en 4 grupos: las que afectan el sistema alimentario (enterotoxemias), las que afectan los órganos del parénquima, las que causan mionecrosis y toxemia y las que causan trastornos neurológicos. Si bien este agrupamiento es conveniente, algunas especies de clostridios pueden estar implicados como causantes de enfermedades en más de un grupo (Cesar, 2010; Lewis, 2011). En la Tabla 1-2 se resumen las enfermedades producidas por las principales especies de *Clostridium* que afectan al ganado.

Las enfermedades clostridiales generalmente no responden al tratamiento antibiótico, porque las toxinas conducen a la aparición de la enfermedad rápidamente, y cuando se observan los síntomas ya se ha producido demasiado daño tisular. La incidencia de las clostridiosis podría disminuirse al reducir la influencia de los factores desencadenantes. Sin embargo, se plantea que es poco probable que estas medidas por sí solas prevengan la enfermedad, por lo que el controles principalmente por vacunación. Las vacunas comerciales, generalmente contienen los toxoides inactivados; con la única excepción de *C. chauvoei*, que requiere la inclusión de su

material celular para inducir inmunidad. Los esquemas de vacunación sugieren 2 dosis, separadas de 4 a 6 semanas, y una revacunación anual (Lewis, 2011).

Grupo de Enfermedades	Organismo	Nombre Enfermedad	Características
Enterotoxemias	*C. perfringens* tipo A	Enterotoxemia ictérica	Enfermedad de los corderos amarillo o enterotoxemia hemolítica. En el cuadro clínico predominan la ictericia, la hemoglobinuria y las muertes repentinas.
	C. perfringens tipo B	Disentería y Enteritis hemorrágica	La disentería afecta a animales de menos de un mes, presetan un síndrome diarreico, que provoca abomasitis y enteritis hemorrágica. La enteritis hemorrágica afecta recién nacidos, que mueren repentinamente, con heces sanguinolentas a causa de hemorragias y úlceras a nivel del abomaso e intestino.
	C. perfringens tipo C	"Struck" o "Pasmo"	Se caracteriza por inducir animales apáticos, inapetentes, con hipertermia y convulsiones, que evolucionan, generalmente a postración, coma y muerte. Pueden aparecer heces pastosas, oscuras y abundantes.
	C. perfringens tipo D	Enfermedad del riñón pulposo	El cuadro clínico es variado, desde muertes súbitas sin sintomatología previa a ligeros síntomas clínicos y diarrea con escasa mortalidad.
	C. septicum	Abomasitis hemorrágica	Afecta a animales jóvenes. Los animales aparecen muertos o febriles, con fuerte dolor abdominal. En la necropsia encontramos abomaso con hemorragias y úlceras.
	C sordellii	Abomasitis y síndrome toxémico	Afecta a animales jóvenes, ocasionándoles muerte súbita, con abomasitis y enteritis, con úlceras abundantes que terminan en peritonitis.
Enfermedades clostridiales que afectan los órganos perinquematosos	*C. novyi* tipo B	Hepatitis necrótica (Enfermedad negra)	La hepatitis necrótica (principalmente en ovinos adultos) se caracteriza por focos múltiples de necrosis en el hígado.
	C. haemolyticum	Hemoglobinuria bacilar	La hemoglobinuria bacilar (se da más en bovinos) se caracteriza por un foco único de necrosis en el hígado
Enfermedades clostridiales con mionecrosis y toxemia	*C. chauvoei*	Carbunco sintomático o "Mancha" y Edema Maligno	A menudo la única observación a nivel de campo es encontrar los animales muertos e hinchados, y sin una sintomatología previa. Pocas veces se pueden ver animales deprimidos, con claudicaciones o alguna hinchazón en grandes masas musculares, las cuales al presionarse se siente que contiene gas.
	C. septicum, C. novyi tipo B *C. sordelli* y *C. perfringens* tipo A	Edema maligno	Principal agente: C. septicum. La infección evoluciona en el tejido subcutáneo y en músculos, produciendo luego septicemia, shock toxi-infeccioso y muerte del animal. En la zona de entrada (herida) se ve hinchazón y la piel tirante. El animal esta decaído, con dolor en la zona y presenta fiebre.
Enfermedades clostridiales neurotrópicas	*C. tetani*	Tétanos	Enfermedad altamente letal que se caracteriza por rigidez muscular y muerte por asfixia. La bacteria se reproduce localmente en la puerta de entrada de la herida y produce toxinas que son transportadas hasta el sistema nervioso central a través de los nervios periféricos.
	C. botulinum tipo C y D	Botulismo	En la mayoría de los casos la enfermedad es subaguda; los pacientes presentan inquietud, incoordinación, marcha insegura y ataxia, seguidos de incapacidad para levantarse o erguir la cabeza, sin pérdida de la sensibilidad cutánea. La muerte ocurre en medio de parálisis respiratoria y los animales conservan la conciencia hasta el final.

Tabla 1-2. Principales enfermedades causadas por las principales especies de *Clostridium* en bovinos y ovinos. Tabla tomada y adaptada de (Cesar, 2010; Lewis, 2011).

1.3.2 | Respuesta inmune contra *Clostridium* spp.

A pesar de la importancia de las enfermedades clostridiales en el ganado, los estudios que evalúan la respuesta inmune humoral y celular inducida por estas bacterias, son escasos y confusos, debido a la complejidad y diversidad del género *Clostridium*. Sumado a esto, los estudios publicados tienen enfoques muy diferentes según sea investigación en vacunas, microbiota, diagnostico, industria cosmética, etc., y además han sido desarrollados en diferentes hospederos como ser el hombre y animales tales como bovinos, ovinos, cerdos y pollos. Esto ha traído complejidad a la hora de revisar y englobar los datos publicados de la respuesta inmune desarrollada por los clostridios. La información se limita principalmente a datos obtenidos en estudios con *C. perfringens*, *C difficile*, *C. sordellii*, *C. tetani* y *C. chauvoei*.

La activación de una respuesta inmune innata requiere de la activación a través de receptores PRRs. En general, se ha establecido que las bacterias grampositivas, como los *Clostridium*, presentan una tendencia a señalizar a través de la vía TLR2, aunque también ha sido sugerida, en menor medida, la señalización a través de TLR4 (Tietze et al., 2006). En este sentido, fue reportado que *C. sordellii* era reconocido por TLR2 y posiblemente por el dímero TLR2/6. Este resultado también fue observado para *C. perfringens* y *C. septicum*, los cuales generaron la activación máxima de NF-κB en células transfectadas que co-expresaban TLR2 y TLR6, sugiriendo que en la pared celular clostridial hay una abundancia relativa de lipoproteínas diaciladas. Por otro lado, mostraron que monocitos humanos, estimulados con *C. sordellii*, y tratados con un anti-TLR2 produjeron un 30% menos de TNF-α, resultado que reafirmó la teoría de que el reconocimiento de estos clostridios sería óptimo si fuese vía el heterodímero TLR2/6 (Aldape et al., 2010). Por otra parte, estudios realizados en pollos infectados con *C. perfringens* mostraron un aumento en la expresión de los genes de la subfamilia de TLR2 en el íleon y de TLR4 y TLR7 en bazo (Lu et al., 2009). En cerdos, la infección por *C. perfringens* tipo C indujo respuestas inmunes a nivel del intestino que involucra la vía de señalización TLR4 (Shi et al., 2019). En humanos, fue reportado que *C. difficile* es reconocido por receptores transmembrana como TLR4 y TLR5, e intracelularmente por NOD1, que censa el ácido meso-diaminopimélico característico del peptidoglicano de este clostridio (Péchiné and Collignon, 2016).

Tradicionalmente, se consideraba que las especies patogénicas de *Clostridium* eran exclusivamente microorganismos extracelulares debido a que producen toxinas capaces de causar graves daños a los hospederos infectados (Popoff and Bouvet, 2009). Sin embargo, en los últimos años, los estudios han demostrado la capacidad de *C. perfringens* (O'Brien and Melville, 2000), *C. difficile* (Paredes-Sabja et al., 2012) y *C. chauvoei* (Pires et al., 2017) para sobrevivir dentro de macrófagos murinos. Las esporas de *C. difficile* sobreviven dentro de los macrófagos murinos hasta 72 h después de la infección, aunque la forma vegetativa es rápidamente eliminada. Las esporas de *C. perfringens* pueden germinar, escapar del fagosoma

y sobrevivir en el citosol del macrófago por 24 h. Estos resultados sugieren que el bajo metabolismo presentado por las esporas dificultaría su reconocimiento por parte de los macrófagos, evitando así la activación de los mecanismos microbicidas de éste (O'Brien and Melville, 2000; Paredes-Sabja et al., 2012). Pires y colaboradores, reportaron que *C. chauvoei* también es capaz de sobrevivir en macrófagos bovinos, y que estos macrófagos infectados con células vegetativas inducen un perfil de expresión génica pro-inflamatorio, mientras que los infectados con esporas muestran un perfil anti-inflamatorio (Pires et al., 2017).

Por otra parte, algunas especies de *Clostridium* producen un aumento en el recuento de glóbulos blancos (linfoides o mieloides), denominado como leucocitosis. Esta leucocitosis, que en general tiene un valor predictivo negativo en el transcurso de las enfermedades, puede ser extrema como en la infección con *C. sordellii*, o leve como se señala para las infecciones con *C. difficile* y *C. novyi* (Aldape et al., 2016).

Uno de los clostridios más estudiados es *C. difficile*, que es un patógeno oportunista que se beneficia del estado de disbiosis de la microbiota intestinal, para crecer en forma excesiva y producir toxinas (TcdA y TcdB), que inducen una potente respuesta inflamatoria local. Ambas toxinas inducen la secreción, por mastocitos y monocitos, de IL-8, IL-16 y prostaglandina E2, implicadas en la migración de neutrófilos y linfocitos; y en macrófagos inducen la producción de TNF-α que desempeña un papel crucial en la inflamación. En las células de la inmunidad innata, las toxinas inducen la activación del inflamasoma, trayendo como consecuencia la activación de linfocitos, producción de IFN-γ y polarización celular a Th1, y la infiltración de leucocitos en los sitios de infección. Las toxinas también interaccionan con las células epiteliales intestinales y las inducen a producir citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-1β e IFN-γ, que promueven el reclutamiento de neutrófilos y otras células inmunes, la secreción de especies reactivas del oxígeno; y de defensinas. Por su parte, las células epiteliales intestinales activan las células dendríticas para producir TNF-α. Estudios realizados en muestras de colon humano y en ratón, demostraron que las toxinas de *C. difficile* estimulan la síntesis de IL-23, que induce la producción de IL-17 y, en consecuencia, la de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, TNF-α, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y quimioquinas (CXCL1-2, CXCL5, IL-8, CCL2, CCL7) [revisado en (Péchiné and Collignon, 2016; Popoff, 2018)]. Seguido de esta inflamación local, los pacientes infectados con *C. difficile*, muestran una respuesta inflamatoria sistémica, caracterizada por una infiltración polimorfonuclear severa asociada con lesiones tisulares, leucocitosis y aumento en las concentraciones séricas de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, mieloperoxidasa y prostaglandina E2. Además, fue reportado que la presencia de citoquinas inflamatorias como IL-8 y CXCL5 en materia fecal, e IL-6 e IL-8 a nivel sérico, se correlacionan con diarrea persistente y gravedad clínica [revisado en (Popoff, 2018)].

Otro de los clostridios más estudiado es *C. sordellii*, que es una bacteria invasiva y puede ingresar vía oral o por una herida en el tegumento, para luego diseminarse a otros tejidos. Este clostridio induce una respuesta inflamatoria local moderada, lo que facilita su propagación y diseminación de toxinas en otros tejidos, causando un síndrome de shock tóxico (Popoff, 2018). Este síndrome es similar al provocado por las infecciones invasivas por estreptococos y estafilococos, el cual está asociado a superantígenos y una respuesta pro-inflamatoria exacerbada y aguda que provoca fiebre alta y puede derivar en una disfunción orgánica múltiple. Sin embargo, el shock tóxico producido por *C. sordellii* no provoca fiebre (Aronoff, 2013), y su ausencia es debido a que su toxina TcsL inactiva las proteínas Ras, evitando la expansión clonal e induciendo la apoptosis de las células inmunes, lo que conduce a una moderada o nula respuesta inflamatoria local (Popoff, 2018).

La infección con *C. perfringens* también ha sido estudiada por diferentes investigadores y en general establecen que puede estimular la secreción de distintas citoquinas como IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-10 e IL-12. Estudios *in vitro* mostraron que cuando se co-cultivan macrófagos murinos con la toxina de *C. perfringens* se induce la síntesis de IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, pero no de IL-2. Este resultado también fue observado en ensayos en ratones donde la enterotoxina indujo una respuesta de las citoquinas pro-inflamatorias IFN-γ, IL-1 β e IL-6 (Wallace et al., 1999). En cerdos, se vio que la infección con *C. perfringens* tipo C aumenta significativamente los niveles de expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias IFN-γ, IL-6 e IL-8 a nivel intestinal (Shi et al., 2019). Las concentraciones de las citoquinas IL-6, IFN-γ, IL-4 y TGF-β también fueron significativamente mayores en los sueros de pacientes con diarrea por C. *perfringens*, comparados con el grupo sano [revisado en (Shi et al., 2019)]. Por otro lado, en pollos con enteritis necrótica, producto de la infección con *C. perfringens* y *Eimeria máxima*, se observó un aumento significativo de los niveles de los ARNm de IFN-γ, IL-1β e IL-10 en el intestino, con respecto a los pollos sanos (Park et al., 2008). Contrariamente, Zhou y colaboradores reportaron que la infección de pollos con este clostridio, reguló negativamente la expresión de los genes IL-2, IL-8, IL-16, IL-18, IL-1β, IFN-γ, CXCR1, CCR8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1β) y la quimioquina AH294 (CCL5) a nivel de bazo (Zhou et al., 2009).

La respuesta celular inducida por *C. tetani* ha sido muy pobremente estudiada. Sin embargo, fue reportado en humanos que el fragmento C de la toxina tetánica está compuesto de "epítopes universales", y que se presenta vía el MHC II (Diethelm-Okita et al., 2000), activando respuestas específicas Th1 productoras de IFN-γ. Confirmando estos resultados, recientemente fue demostrado que células T humanas purificadas responden al fragmento C recombinante y aumentan significativamente los niveles de expresión de los ARNm de T-bet (factor de transcripción específico de Th1) y de IFN-γ (Torabi Goudarzi et al., 2016).

Por otro lado, en los últimos años ha sido reportado que ciertas especies de *Clostridium* que carecen de potentes toxinas, y son parte de la microbiota intestinal, tienen la capacidad para

promover la acumulación de células T_{reg}, e inducirlas a expresar moléculas anti-inflamatorias como IL-10 e ICOS (co-estimulador inducible de células T). La colonización de ratones Germ-free con estas especies clostridiales, proporcionó un entorno rico en TGF-β propicio para estimular la expansión y diferenciación de las células T_{reg} (Atarashi et al., 2013).

La producción de anticuerpos específicos ha sido documentada en respuesta a la vacunación, tanto de animales como del hombre, utilizando vacunas mono o polivalentes (Cerviño et al., 2011; Frerichs and Gray, 1975; Green et al., 1987; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985). No obstante, han sido detectados anticuerpos anti-toxinas de *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. tetani* y *C. botulinum*, en individuos sanos o luego de una infección (Bano et al., 2015; Johnson, 1997). La presencia de anticuerpos en individuos sanos sugiere que tanto los animales como los humanos están expuestos repetidamente a estos clostridios a lo largo de la vida. Péchiné y Collignon, revisaron la bibliografía sobre la respuesta inmune en humanos infectados con *C. difficile*, y reportaron que sus toxinas y otros componentes de la pared inducen una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico y de mucosas. El desarrollo de una respuesta de IgG e IgA en suero se asocia con un resultado clínico favorable y ausencia de recurrencia de infecciones. La ausencia de las subclases IgG2 e IgG3 anti-TcdA mostró mayores niveles de infecciones recurrentes. Del mismo modo, se ha demostrado que los bajos niveles de IgA fecal y la reducción de las células productoras de IgA en la mucosa colónica se asocian con infecciones prolongadas y una mayor recurrencia de infecciones [revisado en (Péchiné and Collignon, 2016)].

1.3.3 │Vacunas clostridiales

1.3.3.1 │*Generalidades*

Las vacunas veterinarias anti-*Clostridium* spp. son vacunas de primera generación, lo que implica que se utilizan técnicas de detoxificación-inactivación o atenuación de microorganismos virulentos. Para su preparación se utilizan antígenos en forma de toxoide o de bacterinas-toxoide. Un toxoide es un producto bacteriano que contiene la toxina o productos de crecimiento con propiedades tóxicas, se encuentra libre de células, no presenta toxicidad (está inactivado) sin embargo es antigénico. Y una bacterina-toxoide es una suspensión bacteriana, de células enteras o particuladas, contenidas en su medio de cultivo o un concentrado del mismo, que ha sido inactivada pero que es antigénica.

Las vacunas disponibles en el mercado difieren en el número de especies de *Clostridium* incluidas y van desde vacunas monovalentes hasta de 10 componentes. En particular, se producen vacunas contra: *C. perfringens* tipo A, C, y D; *C. novyi* tipo B; *C. botulinum* tipo C y D; *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*; *C. septicum*; *C. sordelli* y *C. tetani*. De estas especies los únicos que surgen como una bacterina-toxoide son los cultivos de *C. chauvoei* y de *C. haemolyticum*,

el resto de los cultivos se preparan como toxoides. Los adyuvantes más utilizados para las vacunas clostridiales polivalentes son a base de aluminio (hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alumbre), pero los adyuvantes oleosos también se usan para vacunas mono o bivalentes (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019).

Los protocolos para las pruebas de eficacia y/o potencia específicos para cada especie de *Clostridium*, están establecidos en ambos códigos (*Ph. Eu.* y CFR) por lo que las industrias productoras pueden adherirse a uno u otro indistintamente de acuerdo a los mercados de venta.

La eficacia de una nueva vacuna clostridial debe evaluarse para cada especie de *Clostridium* incluida en la formulación, mediante experimentos de vacunación y desafío en el animal de destino. Las pruebas de potencia son realizadas rutinariamente sobre todos los lotes de vacunas fabricados para obtener la aprobación para liberarlos al mercado. Este test consiste en evaluar la capacidad de una vacuna de generar anticuerpos neutralizantes contra los toxoides y bacterinas, ya sea por desafío directo con una cepa virulenta de un animal de experimentación vacunado, o indirectamente por ensayos de seroneutralización de la toxina. Las regulaciones internacionales han establecido para cada especie clostridial un valor de "*pass-mark*", a partir del cual se asegura que la especie de destino estaría protegida frente a esa enfermedad (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019).

1.3.3.2 | *Inmunidad asociada a la vacunación clostridial*

Los estudios que describen la respuesta humoral inducida por las vacunas clostridiales en el ganado bovino y ovino son escasos y la información aportada es parcial. Las vacunas disponibles comercialmente difieren en su composición, y por ende pueden tener diferentes capacidades para inducir inmunidad protectiva contra los diferentes clostridios (Crichton et al., 1986; Green et al., 1987). Sin embargo, el control exitoso sobre la incidencia a nivel mundial de las enfermedades clostridiales, gracias a la vacunación sistemática del ganado, ha demostrado que las vacunas inducen inmunidad protectiva en los animales de destino (Brown et al., 1976; Lewis, 2011).

En general, es aceptado que el principal correlato de protección asociado a las vacunas clostridiales es el título de anticuerpos contra los antígenos incluidos en las mismas. De hecho, en las últimas décadas varios investigadores han reportado que la vacunación induce una respuesta humoral a nivel sistémico, con altos niveles de anticuerpos IgG específicos contra los antígenos clostridiales, y en particular, algunos de estos estudios titulan anticuerpos neutralizantes específicos (Cerviño et al., 2011; Frerichs and Gray, 1975; Green et al., 1987; Kerry and Craig, 1979; Steinman et al., 2007; Troxel et al., 1997; Uzal et al., 1998; Webster and Frank, 1985). En su gran mayoría los artículos reportan la respuesta humoral contra algunos, y

no contra todos los clostridios incluidos en las vacunas policlostridiales, así es que las respuestas más estudiadas son contra los antígenos de *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* tipo B y *C. tetani* (Frerichs and Gray, 1975; Green et al., 1987; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985). En la bibliografía surge un único estudio realizado en bovinos que muestra la respuesta de anticuerpos contra todos los antígenos incluidos en las vacunas analizadas (una 8-valente y otra 10-valentes). Si bien los autores reportan que, ambas vacunas fueron capaces de inducir una respuesta de IgG contra todas las valencias dos semanas después de la segunda dosis, el estudio careció de estadística debido a que la titulación fue realizada con pooles de sueros (Cerviño et al., 2011).

Por otra parte, fue reportado que la vacunación policlostridial induce una respuesta de anticuerpos IgG con una gran variación inter-individual. Esta variación fue observada en la respuesta contra *C. botulinum* tipo D en bovinos vacunados con una vacuna bivalente (*C. botulinum* tipo C y D) (Steinman et al., 2007). En ovinos también fue demostrada la variabilidad de la respuesta de anticuerpos contra *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* tipo B, *C. septicum* y *C. tetani* (Frerichs and Gray, 1975; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985). Además, Kerry y Craig (1979) identificó buenos y malos respondedores a las vacunas clostridiales en función de los títulos de anticuerpos contra *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* y *C. tetani* (Kerry and Craig, 1979). La identificación de altos y bajos respondedores también ha sido reportada en bovinos en base a la producción de anticuerpos anti-*C. difficile* en la leche luego de inmunizaciones repetidas con una vacuna monovalente contra este clostridio (Schmautz et al., 2018a).

Las vacunas clostridiales son administradas con un esquema de 2 dosis, con una diferencia de 4 a 6 semanas entre ellas, seguido de revacunación al año. Generalmente, se acepta que este esquema típico de vacunación es suficiente para establecer niveles mínimos de anticuerpos protectivos. Las empresas productoras de vacunas indican un refuerzo anual, aunque afirman que los anticuerpos se mantienen durante un año con niveles por encima del valor mínimo requerido para proteger a los animales de destino. Sin embargo, son escasos y parciales los reportes bibliográficos que documentan la dinámica de mantenimiento de anticuerpos específicos circulantes en la especie objetivo. Tampoco surgen reportes que muestren la presencia al año de niveles de anticuerpos suficientes para proteger a los animales vacunados frente a una infección. En particular, Steinman y colaboradores demostraron que sólo un pequeño porcentaje (15 al 31%) de los bovinos vacunados contra *C. botulinum* tipos C y D, con el esquema tradicional de dos dosis y una revacunación anual, tenían niveles de anticuerpos significativos al momento del refuerzo anual. La incorporación de un refuerzo a los 6 meses demostró ser suficiente para mantener los niveles de anticuerpos, al año, por encima de los valores mínimos para proteger a los animales (Steinman et al., 2007). Resultados similares fueron encontrados en cabras vacunadas con la vacuna monovalente contra *C. perfringens* tipo D, quienes en su gran mayoría no tenían anticuerpos por encima de los valores de corte a los

98 días post-vacunación (Uzal et al., 1998). En concordancia con estos reportes, un estudio reciente detectó anticuerpos neutralizantes contra los toxoides de *C. botulinum* tipo C y D, y *C. perfringens* D, en el rango del 40 al 78% de los bovinos vacunados con 6 vacunas policlostridiales de diferentes laboratorios. No obstante, sólo el 12,5% de los animales mostró anticuerpos neutralizantes contra todos los antígenos probados, los cuales fueron detectados hasta los 6 meses post-vacunación, demostrando así que los bovinos permanecieron sin protección durante un largo período, antes de la revacunación recomendada (de Oliveira Júnior et al., 2019). Por el contrario, Troxel y colaboradores detectaron, en vacas que habían recibido dos dosis (pre y post parto) de una vacuna comercial 7-valente, anticuerpos contra *C. perfringens* tipo C y D, y *C. chauvoei* a los 300 días post-vacunación (Troxel et al., 1997).

Con respecto a la respuesta celular inducida por vacunas policlostridial, la bibliografía sobre su estudio es muy escasa. En particular, en las últimas dos décadas, ha habido un importante desarrollo de vacunas a DNA o recombinantes contra toxinas de algunos *Clostridium* spp., y es sobre estas formulaciones donde se ha avanzado levemente en el estudio de las respuestas contra los clostridios (Zaragoza et al., 2019). Así, por ejemplo, ha sido reportado el uso de vacunas orales probióticas diseñadas con una cepa *Lactobacillus casei* expresando constitutivamente los toxoides α, ε, β1 y β2 de *C. perfringens*. Ratones vacunados con dicha cepa mostraron altos niveles de IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN-γ y de anticuerpos neutralizantes en suero (Gao et al., 2019); y una respuesta de IgG e IgA a nivel de mucosa (Ding et al., 2019). Ding y colaboradores además reportaron que en ensayos de proliferación con PBMCs de ratones vacunados frente a las toxinas recombinantes hubo un aumento del porcentaje de células T $CD4^+$ y $CD8^+$con respecto a la cepa control de *L. casei* (Ding et al., 2019). Resultados similares fueron obtenidos con esta misma vacuna, pero expresando solo la toxina de *C. perfringens* (Gao et al., 2019). Previamente, había sido demostrado que las toxinas recombinantes administradas en ratones, ganado y animales de granja eran eficaces induciendo una respuesta de anticuerpos neutralizantes (Ferreira et al., 2016; Zeng et al., 2011). Por otro lado, en un ensayo de vacunación contra *C. difficile* en bovinos encontraron diferencias en los niveles de expresión de los genes de lactoferrina, CXCL8, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12b, IFN-γ, CD4 y CD163 entre los altos respondedores y bajos respondedores de IgA en leche (Schmautz et al., 2018b).

Resultados obtenidos en el marco de una tesina de grado llevada a cabo en nuestro laboratorio demostró que la revacunación anual con vacunas policlostridiales conduce a un rápido e importante aumento del título de anticuerpos contra la toxina de *C. chauvoei* (Rivera, 2014). Steinman y colaboradores también reportaron importante aumento del título de anticuerpos contra las toxinas de *C. botulinum* (Steinman et al., 2007). Estos aumentos del título de anticuerpos específicos, luego de la revacunación anual, sugieren que las vacunas policlostridiales inducen una respuesta de memoria. Sin embargo, no existen reportes sobre la

inducción de células de memoria por vacunas policlostridiales en el ganado, si bien de la bibliografía surgen unos pocos estudios realizados en el modelo murino. En particular, ha sido reportado que el dominio C no tóxico de la toxina de B de *C. difficile* puede ser un buen inmunógeno para estimular la activación de las células B memoria, que producen anticuerpos neutralizantes que confieren protección contra la toxina secretada. Además, en ratones previamente inmunizados, vieron aumentados los títulos de IgG1, IgG2b e IgG2c específicos frente a una estimulación con la toxina CTD1. Los autores plantean que la capacidad de CTD1 para estimular una respuesta mayor de anticuerpos, a 60 días después de una inmunización primaria, es consistente con la inducción de células B de memoria (Devera et al., 2015). Por otro lado, fue reportado un estudio donde se demostró el desarrollo de una respuesta de células B de memoria en ratones vacunados con *L. acidophilus* expresando un péptido de la toxina A de *C. botulinum* (Sahay et al., 2018).

En suma, las vacunas veterinarias han alcanzado un alto grado de eficacia e inocuidad, sin embargo, aún hay aspectos críticos que requieren soluciones que podrían ser aportadas desde la investigación básica y la biotecnología moderna. En este sentido, uno de los puntos críticos es la definición de correlatos de protección más precisos en las especies de destino, siendo esto de central importancia tanto para el desarrollo racional de nuevas vacunas como para evaluar en forma más certera la eficacia de las vacunas en uso. Para ello, se torna esencial profundizar en el conocimiento de las respuestas inmunes asociadas a la vacunación efectiva a partir de ensayos a campo. El conocimiento sobre la respuesta inmune en grandes animales como bovinos y ovinos es sensiblemente menor que el que se tiene en animales de laboratorio, que no siempre reproducen adecuadamente lo que sucede en las especies de destino.

En este contexto, nos propusimos contribuir al conocimiento de la respuesta inmune inducida en ganado bovino y ovino por las vacunas contra enfermedades de relevancia veterinaria. Para ello, contamos con colaboraciones con dos empresas productoras de vacunas animales, una nacional y otra extranjera, que nos permitió acceder a muestras relevantes de ensayos de vacunación en especies veterinarias, que de otra manera habría sido difícil de obtener, dada la complejidad del trabajo con este tipo de animales. En particular, nos centramos en ensayos de vacunación contra la fiebre aftosa y enfermedades clostridiales en bovinos y ovinos, para avanzar en el conocimiento de las respuestas inmunes protectivas en estas especies veterinarias.

1.4 | *OBJETIVOS*

1.4.1 | Objetivo General

Avanzar en el conocimiento de las respuestas inmunes asociadas a la vacunación de bovinos y ovinos contra enfermedades veterinarias de importancia mundial, con el objetivo de avanzar en la definición de correlatos inmunológicos de protección que permitan evaluar la eficacia de vacunas de manera más precisa.

1.4.2. | Objetivos Específicos

1) Analizar la respuesta transcripcional global de bovinos vacunados y desafiados contra la fiebre aftosa, y establecer marcadores moleculares inmunológicos asociados a la protección efectiva contra la infección por el virus.
2) Estudio de las respuestas inmunes asociadas a la vacunación y protección contra *Clostridium* spp. en bovinos y ovinos vacunados con vacunas policlostridiales.

CAPITULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 | DISEÑO EXPERIMENTAL Y MUESTREO

2.1.1 | Modelo Aftosa

En esta tesis se analizaron muestras de sangre de bovinos, provenientes de ensayos de potencia y eficiencia de vacunas comerciales y experimentales contra la fiebre aftosa. Estos ensayos fueron realizados por la empresa colaboradora argentina, conjuntamente con el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), en el marco de las rutinas de control. Todas estas pruebas fueron llevadas a cabo como describe (Goris et al., 2008) y de acuerdo con la Ley SENASA Nº 351/2006 (SENASA, 2006) y el Manual de la OIE (OIE, 2018a).

2.1.1.1 | Animales

Los animales utilizados para ambos tipos de ensayos fueron bovinos machos castrados de la raza *Hereford*, de entre 18 y 36 meses de edad y un peso de 300 kg. Los bovinos han sido reproducidos y criados en la zona libre de aftosa sin vacunación de Argentina (por debajo del paralelo 42 en la Patagonia) (OIE, 2019). Previo al comienzo de las pruebas, los animales fueron trasladados al Campo experimental del SENASA, ubicado la provincia de La Pampa, donde fueron mantenidos bajo condiciones controladas, con régimen de comida y agua *ad libitum*, hasta su vacunación.

2.1.1.2 | Vacunas

En esta tesis fueron analizados ensayos en los cuales se administraron dos tipos de vacunas, una tetravalente y una monovalente. La primera es la formulación que se utiliza actualmente en las campañas contra la fiebre aftosa y contiene los serotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 y C3 Indaial. La monovalente fue una preparación experimental con el serotipo O1 Campos. En ambos tipos de vacunas el serotipo O1 Campos fue incluido en la misma (20 μg/dosis). Las vacunas utilizadas fueron adyuvantadas con adyuvante oleoso.

2.1.1.3 | Ensayos de vacunación

En el contexto de esta tesis fueron analizadas muestras de sangre de bovinos provenientes de 6 ensayos de vacunación, los cuales denominamos Experimentos N° 1 al N° 6. (Exp. 1-6). En estas pruebas (desarrolladas para determinar la potencia de los lotes vacunales) se seleccionan 18 bovinos con serología negativa contra las NSP de FMDV, de los cuales 16 son vacunados intramuscularmente, en la parte superior del cuello, con una dosis para ganado (2 ml) de la vacuna tetravalente (serotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 y C3 Indaial) y 2 animales son incluidos como control sin vacunar.

A los 60 dpv, la empresa sangra los 18 bovinos para titular el nivel de anticuerpos contra los serotipos incluidos en la vacuna mediante el LPB-ELISA (OIE, 2018a). Estos datos nos fueron cedidos para analizar una posible correlación entre la respuesta transcripcional y los niveles de anticuerpos.

Para analizar la respuesta transcripcional, los bovinos fueron sangrados a los 30 dpv y la sangre fue colocada en tubos Vacutainer con Heparina de Litio (BD). Posteriormente, todas las muestras fueron trasladadas desde el Campo Experimental hasta el laboratorio del Dr. Podhajcer (FIL) donde fueron procesadas (Sección 2.3.2, M&M). El traslado fue vía terrestre en frío (mediante el uso de refrigerantes) durante aproximadamente 24 horas (llamada "*sangre conservada*"). Todos los traslados estuvieron a cargo de la empresa colaboradora, y requirieron de una ajustada logística para asegurar el tiempo y temperatura del transporte.

2.1.1.4 | Ensayos de vacunación/desafío

Las pruebas de vacunación/desafío que permiten evaluar la eficacia de una vacuna fueron realizadas mediante el test PPG (del inglés *Protection against Podal Generalization*) (OIE, 2018a), descrito en la Sección 1.2.3.1. En esta tesis, nos centramos en tres pruebas a las que denominamos Experimentos N° 7, 8 y 10, en las cuales el desafío fue realizado a los 30 dpv. El Exp. 7 fue un ensayo de eficacia heterólogo en el cual se vacunó con O1 Campos y se desafió con O Corrientes). El Exp. 8 fue un ensayo de eficacia homóloga (vacunación O1 Campos y desafío con el mismo serotipo), mientras que el Exp. 10 fue un ensayo de eficacia con la vacuna tetravalente y el desafío con O1 Campos.

Para la realización de estas pruebas fueron seleccionados 18 bovinos con serología negativa contra las NSP de FMDV, de los cuales 16 recibieron una dosis completa de la vacuna (2 ml) vía intramuscular en la parte superior del cuello. Los 2 bovinos restantes fueron incluidos como control sin vacunar (naïve). A los 30 días de la vacunación, los bovinos fueron trasladados a las instalaciones de seguridad del INTA Castelar para su desafío, el cual fue realizado, en la lengua, con 10^4 dosis infectivas bovinas (BID_{50}) del virus vivo vía intradérmica. Siete días después, se realizó la lectura (evaluación clínica para detectar lesiones en extremidades y sitio de inoculación), se verificó que los bovinos control presentaran las lesiones esperadas en las extremidades, y se determinó el porcentaje de protegidos (ausencia de lesiones inducidas por FMVD en las extremidades) y no protegidos (presencia de lesiones podales). A los 30 dpv (previo al desafío), todos los bovinos fueron sangrados para titular la respuesta de anticuerpos y para analizar la respuesta transcripcional. Los inmunoensayos (LPB-ELISA) fueron realizados por la empresa colaboradora y los títulos contra los serotipos incluidos en la vacuna nos fueron cedidos gentilmente para analizar una posible correlación con los niveles de expresión de citoquinas. La empresa colaboradora nos cedió los datos de la serología de estos tres ensayos, y la sintomatología clínica post-desafío con FMDV provenientes de los Exp. 8 y 10.

Las muestras de sangre para analizar la respuesta transcripcional fueron colocadas individualmente en tubos Vacutainer con Heparina de Litio (BD). Su traslado hasta el FIL fue realizado por la empresa colaboradora, en frío (utilizando refrigerantes) y en un tiempo de aproximadamente 4 horas desde su extracción (llamada "*sangre fresca*").

2.1.2 | Modelo Enfermedades Clostridiales

Las muestras de sangre analizadas en esta tesis en el marco del modelo de enfermedades clostridiales fueron cedidas por la empresa uruguaya productora de vacunas clostridiales. Estas muestras fueron obtenidas a partir de dos ensayos (*Ensayo A* y *B*) realizados como parte de las rutinas de control de sus vacunas (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019). Todos los procedimientos experimentales fueron realizados por la empresa y cumplieron con las normativas y directrices éticas nacionales e institucionales vigentes, y también fueron aprobados por la Comisión de Experimentación Animal (CHEA), Universidad de la República, Uruguay.

2.1.2.1 | Animales

Para el *Ensayo A* fueron adquiridos a un proveedor local 45 bovinos de raza *Holando* de 6 meses de edad, de aproximadamente 150 kg, y 45 ovinos de raza *Corriedale* de 4 meses de edad. El *Ensayo B* utilizó 11 bovinos de la misma raza y características que los empleados en el *Ensayo A*. Los ovinos fueron mantenidos en corrales durante el periodo que duró el ensayo, mientras que los bovinos de ambos ensayos estuvieron siempre a campo, todos en condiciones de alimento y agua *ad libitum.* Previo al inicio de los ensayos, los animales fueron tratados con agentes antiparasitarios (Ivomec®, 1 cc por 33 kg de peso). A lo largo del estudio, los animales fueron evaluados clínicamente por veterinarios, y durante el período de inmunización se controló la reacción en el lugar de la inoculación.

2.1.2.2 | Vacunas

Se utilizaron dos vacunas clostridiales: 1) una vacuna disponible comercialmente Covexin10 (MSD Animal Health, lote # 1384A) a la que denominamos Vacuna de referencia; y 2) una vacuna experimental (llamada Vacuna experimental) preparada por la empresa colaboradora. Ambas vacunas contienen toxoides de *C. novyi* tipo B; *C. perfringens* tipos A, C y D; *C. septicum*; *C. sordellii* y *C. tetani*; y bacterina de *C. chauvoei*. La vacuna de referencia incluye el toxoide de *C. haemolyticum*, mientras que en la vacuna experimental *C. haemolyticum* fue incluido como bacterina. El alumbre de potasio y el gel de hidróxido de aluminio son los adyuvantes de las vacunas de referencia y experimentales, respectivamente.

La vacuna experimental fue elaborada mezclando antígenos (Sección 2.2.2.1, M&M) en cantidades previamente determinadas utilizando un sistema patentado para definir el contenido de antígenos. Todos los antígenos fueron obtenidos de cultivos de producción de cada especie específica de *Clostridium*. La cantidad de adyuvante añadida fue suficiente para alcanzar una concentración final de aluminio en la vacuna de 1,5 mg/ml. Se utilizó fenol como conservante.

Antes de usar las vacunas de referencia y experimental, la empresa colaboradora evaluó la potencia de ambas cada una de las especies de *Clostridium* incluidas siguiendo las pautas apropiadas (CFR, 2019; Ph. Eur., 2019) y confirmó que todos los antígenos tenía la potencia mínima requerida por la reglamentación .

2.1.2.3 | *Ensayo A*

En este ensayo fue estudiada la respuesta inmune asociada a la vacunación clostridial de ovinos y bovinos a diferentes tiempos de post-vacunación a lo largo de un año.

Previo al comienzo de este ensayo, se evaluó la reactividad de los animales contra cada uno de los antígenos incluidos en la vacuna por ELISA (Sección 2.7, M&M). Para ello, se sangraron 45 bovinos y 45 ovinos sin tratamiento previo, se titularon los niveles de anticuerpos, y se definió un valor de *cut-off* que representa los niveles basales de anticuerpos en la población estudiada y permite por tanto definir los aumentos específicos asociados a la vacunación.

A posteriori, fueron seleccionados al azar, a partir los 45 bovinos y 45 ovinos naïve, los 25 animales de cada especie empleados en el *Ensayo A*. Los ovinos y bovinos fueron divididos al azar en tres grupos, dos grupos, de 10 animales cada uno, recibieron una de las dos vacunas: la Experimental o la de Referencia, ambas detalladas en la Sección 2.1.2.2 (M&M). Los 5 ovinos o bovinos restantes, permanecieron sin vacunar como grupo de control y recibieron PBS en su lugar. Las vacunas fueron administradas vía subcutánea con una dosis de 3 ml y 4 ml para ovinos y bovinos, respectivamente. Todos los animales recibieron dos dosis subcutáneas de una de las vacunas o PBS con un intervalo de 21 días. La sanidad animal se controló semanalmente durante todo el estudio.

Todos los animales fueron sangrados para producir suero justo antes de la primera dosis de vacuna (0 dpv), a los 15 días después de la segunda dosis (36 dpv) y luego a los 90, 180 y 360 dpv. Para ello, la sangre fue colocada individualmente en tubos Vacutainer secos (BD) y los sueros fueron almacenados a -20°C hasta su análisis por ELISA.

Para analizar la respuesta celular, fueron seleccionados al azar 5 ovinos y 5 bovinos de cada grupo vacunado (Vacuna Experimental o Referencia) y los 5 animales del grupo control, que fueron sangrados a los 0 y 36 dpv. Las muestras de sangre de ambos tiempos fueron colocadas individualmente en tubos Vacutainer con heparina de litio (BD). El traslado hasta nuestros laboratorios fue realizado por la empresa colaboradora, en frío (utilizando

refrigerantes) y en un tiempo de aproximadamente 4 horas desde su extracción. Una vez que la sangre heparinizada llegó a nuestro laboratorio ésta fue procesada inmediatamente (Sección 2.3.2, M&M).

2.1.2.4 | *Ensayo B*

El *Ensayo B* fue realizado en bovinos para evaluar la eficacia contra *C. chauvoei* inducida por la vacuna experimental detallada en la sección 2.1.2.2 (M&M). Once bovinos fueron divididos al azar en dos grupos: el grupo Vacunado de 8 animales que recibió 2 dosis (4 ml) de la vacuna a los 0 y 42 días, y el grupo Control con 3 animales que permanecieron sin vacunar y recibieron PBS en su lugar.

A los 69 dpv, todos los bovinos fueron desafiados vía intramuscular en el cuarto posterior con 8000 DL50% (Dosis letal 50% de ratón) de una suspensión de esporas de *C. chauvoei*. Los animales fueron observados las 72 horas posteriores por veterinarios de la empresa quienes registraron y elaboraron un score clínico con los datos de la sintomatología clínica, temperatura y lesiones a nivel del miembro afectado. El score clínico fue dividido en cuatro categorías: (-) sin cambios aparentes al tacto; (+): leve tumefacción; (++): tumefacción aparente, leve deformación del miembro, presencia de edema; y (+++): gran tumefacción, importante deformación del miembro, calor al tacto e importante presencia de edema.

Todos los bovinos fueron sangrados antes de la primera dosis de vacuna (0 dpv), luego de la segunda dosis de la vacuna y previo al desafío (69 dpv) y a las 24 horas post-desafío (70 dpv). De cada animal, se obtuvo sangre para analizar la respuesta humoral y celular, para ello las muestras fueron colocadas individualmente en tubos Vacutainer secos (BD) y con heparina de litio (BD), respectivamente. El traslado hasta nuestros laboratorios fue realizado por la empresa colaboradora, en frío (utilizando refrigerantes) y en un tiempo de aproximadamente 4 horas desde su extracción. La sangre heparinizada fue procesada al momento de llegada a nuestro laboratorio (Sección 2.3.2, M&M), mientras que los suero fueron almacenados a -20°C hasta su análisis por ELISA.

2.2 | ANTÍGENOS

2.2.1 | *Modelo Aftosa*

Para estudiar la respuesta transcripcional diferencial asociada a la vacunación contra aftosa fue utilizado antígeno inactivado de FMDV del serotipo O1 Campos. Un total de 8 preparaciones antigénicas diferentes fueron evaluadas durante la optimización de las técnicas (Anexo 2 y Tabla A4) hasta lograr un antígeno óptimo para estimular las muestras de sangre (Ag9 y Ag10). Todas las preparaciones antigénicas fueron gentilmente provistas por la empresa colaboradora

productora de la vacuna contra FMDV. Los antígenos Ag9 y Ag10 fueron preparados utilizando un protocolo optimizado por el grupo del Dr. Pérez-Filgueira del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Castelar, en el cual las partículas virales 140S fueron purificadas a partir de un gradiente de densidad de sacarosa y posteriormente resuspendidas en PBS (Pega et al., 2015).

2.2.2 | *Modelo Enfermedades clostridiales*

Los antígenos utilizados en esta tesis fueron obtenidos a partir de las siguientes cepas de *Clostridium*: *C. chauvoei* (8070), *C. haemolyticum* (9693), *C. novyi* tipo B (6577); *C. perfringens* tipos A (8246), C (3181) y D (13170), *C. septicum* (547), y *C. sordellii* (8780). Todas las cepas fueron adquiridas por la empresa productora del *National Collection of Type Cultures* (NCTC) de *Public Health England* (PHE), excepto la cepa de *C. tetani* (H2B79 0709) que fue obtenida de la colección del Instituto de Higiene.

2.2.2.1 | *Antígenos vacunales*

Para la preparación de los antígenos incluidos en la vacuna Experimental, cada una de las cepas clostridiales fueron cultivadas anaeróbicamente en un medio apropiado (medios Mueller y Miller con variaciones de acuerdo a la cepa cultivada) a 37°C durante 6 a 8 h, excepto *C. tetani* que se cultivó durante 10 días. A continuación, los cultivos se inactivaron con formaldehído (0,8% v/v) y se verificó la inactivación completa de la toxina inyectando por vía intraperitoneal 0,5 ml de cada preparación en ratones. Los cultivos de *C. chauvoei* y *C. haemolyticum*, para la preparación de bacterina, se diafiltraron contra PBS y se concentraron por ultrafiltración usando membranas de corte de 30 kDa. En cambio, *C. novyi* tipo B inactivado; *C. perfringens* tipos A, C y D; *C. septicum*, *C. sordellii* y *C. tetani* se centrifugaron a 15.000g durante 10 min, se separó el sobrenadante transparente y luego se diafiltró con PBS y se concentró por ultrafiltración utilizando membranas de corte de 30 kDa. Todos los antígenos fueron mantenidos refrigerados hasta su uso. La prueba de esterilidad se realizó inoculando el contenido de la vacuna en medio de caldo de soja tríptico y tioglicolato, e incubando durante 14 días a 37°C. La concentración de formalina residual en todos los antígenos se midió después de la diálisis siguiendo las pautas apropiadas (VICH GL25 Biologicals: prueba de formaldehído residual).

2.2.2.2 | *Antígenos para estimulación in vitro*

Para estudiar el perfil de expresión de citoquinas fueron utilizados antígenos de *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo B y *C. septicum* libres de formaldehído. El antígeno de *C. chauvoei* también fue

empleado para analizar la linfoproliferación específica de bovinos desafiados con este clostridio.

El antígeno de *C. chauvoei* fue preparado a partir del cultivo entero, proveniente de un lote de producción de la empresa, mediante la inactivación por calor y 15 ciclos de sonicado (ciclos de 10 segundos a máxima amplitud). Posteriormente, el sonicado fue centrifugado y el sobrenadante fue guardado a -80°C hasta su uso. Mientras que, para *C. perfringens* tipo B y *C. septicum* utilizamos como antígeno las toxinas purificadas por la empresa colaboradora, las cuales fueron inactivadas por calor y guardadas a -80 °C hasta su uso.

Todos los antígenos fueron cuantificados utilizando el reactivo de Bradford (Sigma), según indicaciones del fabricante. Para realizar la curva estándar se empleó una solución estándar de 2 mg/ml de seroabúmina bovina (BSA) (Sigma) a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas.

2.2.2.3 | *Antígenos sensibilizantes (ELISA)*

Los antígenos utilizados para sensibilizar los ELISAs específicos fueron los mismos antígenos con los que se formuló la vacuna experimental. Los antígenos sensibilizantes de *C. chauvoei* y *C. haemolyticum* fueron preparados, a partir de las bacterinas, mediante ciclos de sonicados y posterior centrifugado como se detalló en la Sección 2.2.2.2 (M&M).

Los antígenos fueron cuantificados utilizando el reactivo de Bradford como se detalló en la Sección 2.2.2.2 (M&M).

2.3 | ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN *IN VITRO*

2.3.1 | *Modelo Aftosa*

2.3.1.1 | Estimulación de sangre entera

La respuesta transcripcional frente a la vacunación contra FMDV fue estudiada en muestras de sangre heparinizadas que fueron estimulada *in vitro* con antígeno viral. Brevemente, se distribuyeron 1 ml/pocillo de las muestras de sangre (tres pocillos por cada bovino) en placas de cultivo de 48 pocillos (Greiner). La sangre de cada animal se estimuló con: 10 μg/ml del antígeno de FMDV (Sección 2.2.1, M&M), 20 μg/ml Concanavalina A (ConA) (Sigma) como control positivo, y PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$ pH 7,4 (Sigma) como control sin estimular (negativo). La sangre junto con el antígeno y los controles se incubó por 6 horas a 37 ºC y 5% CO_2 (Dar et al., 2015).

Finalizada la estimulación se lisaron los eritrocitos, para ello se agregó a la sangre el buffer de lisis EL (QIAGEN) en una relación 1:5 (vol/vol) de acuerdo con las especificaciones del

fabricante. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 500g por 10 min a 4°C, y el pellet se lavó con PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$. Por último, los PBLs se homogeneizaron en TRIzol (en una relación 1:1 vol/vol de sangre y TRIzol), y se conservaron a -80°C hasta su utilización para extracción de ARN.

2.3.1.2 | Estimulación de PBMC

Durante la puesta a punto de la técnica (Anexo 2) fueron purificados los PBMC a partir de sangre entera de bovinos mediante el siguiente protocolo: se preparó un gradiente agregando cuidadosamente 5 ml de sangre heparinizada que, previamente diluida en igual volumen de PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$, sobre un colchón de 5 ml de Ficoll-1077 (Capricorn). El gradiente se centrifugó a 400g durante 40 min., se recolectó la interface que contiene los PBMC, que fue lavada dos veces con PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$.

Los PBMC fueron colocados en el medio RPMI completo (cRPMI) hasta su cultivo. El cRPMI fue preparado de acuerdo al siguiente protocolo: RPMI-1640 (Sigma), 10% de suero bovino fetal (SFB) (Capricorn), 0,05 mM β-mercaptoetanol (Sigma), 2,5 mM L-glutamina (Sigma), y una solución antibiótico/antimicótico 100X (Sigma). El número de células viables se determinó por recuento en cámara de Neubauer (Invitrogen) con azul de Trypan (Invitrogen). Para la estimulación, se distribuyó 1 ml/pocillo de una suspensión de $1x10^6$ células/ml de PBMC en placas de cultivo de 48 pocillos (Greiner). A continuación, se estimuló con el antígeno de FMDV y los controles, en las mismas condiciones que la sangre entera (Sección 2.3.1.1, M&M). A las 6 hs, las células se lavaron con PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$, se homogeneizaron en TRIzol (en una relación 1:1 vol/vol de cultivo celular y TRIzol), y se conservaron a -80°C hasta su utilización para extracción de ARN.

2.3.2 | *Modelo Enfermedades clostridiales*

La respuesta celular en este modelo fue estudiada mediante la valoración de los perfiles de expresión de citoquinas (*Ensayos A* y *B*) y la linfoproliferación frente al antígeno de *C. chauvoei* para los bovinos del *Ensayo B*.

2.3.2.1 | Estudio del perfil de expresión génica de citoquinas

La estrategia experimental utilizada para estudiar la expresión de citoquinas fue similar a la desarrollada en el modelo de aftosa (Sección 2.3.1, M&M). Brevemente, sangre heparinizada ovina o bovina del *Ensayo A* (1 ml/pocillo) fue estimulada con 15 μg/ml de los antígenos de *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo D y *C. septicum* (Sección 2.2.2.2, M&M). Mientras que la sangre de los bovinos del *Ensayo B* fue estimulada con 15 μg/ml del antígeno de *C. chauvoei.* La

estimulación, en ambos ensayos y en todos los tiempos analizados, fue realizada durante 6 h 37ºC y 5% CO_2 y fueron incluidos un control positivo (20μg/ml de ConA) y uno negativo (PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Finalizada la estimulación, se lisan los eritrocitos, y se agrega el TRIzol (relación 1:1 vol/vol), y se conservan a -80 °C hasta la extracción de ARN.

2.3.2.2 | Ensayos de linfoproliferación

Estos ensayos fueron realizados en el contexto del *Ensayo B*, a partir de sangre de los 8 bovinos vacunados y 3 control, extraída previo (69 dpv) al desafío con *C. chauvoei* y a las 24 h del mismo (70 dpv). Para ello, los PBMC purificados fueron marcados con CFSE (del inglés: Carboxy fluorescein succinimidyl ester) de modo de poder seguir la proliferación por citometría de flujo en respuesta a la estimulación antigénica. Brevemente, una suspensión de PBMC de 2 $X10^6$ células/ml en PBS, purificados siguiendo el protocolo detallado en la Sección 2.3.1.2 (M&M), fue marcada con 3 μM CFSE por 10 min a 37°C. Finalizado el marcado, se neutralizó el CFSE excedente con 1 ml de SFB por cada 2 ml de suspensión celular y se lavó dos veces con PBS libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$. Los PBMC marcados de cada animal fueron resuspendidos en cRPMI a una densidad de $1x10^6$ células/ml, distribuidos de a 500 μl/pocillo en una placa de cultivo de 48 pocillos (Greiner) y estimulados con 15 μg/ml del antígeno de *C. chauvoei*, con 20 μg/ml de ConA (control positivo), y con PBS (control negativo sin estimular). De cada animal, fue incluido además un control de células sin marcar. Los cultivos se incubaron 4 días a 37°C y 5% CO_2. Finalizada la estimulación, las células fueron marcadas con anticuerpos para detectar las principales poblaciones celulares linfocitarias siguiendo el protocolo detallado en la Sección 2.8 (M&M).

2.4 | RT-qPCR

La determinación de los niveles de mensajeros se realizó a partir de células de sangre bovina y ovina en cultivo estimuladas con antígenos de aftosa o clostridiales, seguido de extracción de ARN total y retrotranscripción (RT) empleando Random hexamer primers y la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen).

2.4.1 | ARN

La extracción de ARN con TRIzol se realizó según protocolo descrito por el fabricante, con un paso de extracción con cloroformo, precipitación en alcohol isopropílico y lavado con etanol 75% y posterior resolubilización en agua ultra pura incubándose a 65°C durante 10 min.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en Nanodrop (ThermoFisher Scientific) a 260 nm. La calidad de los ARN fue evaluada mediante las relaciones de absorbancia: A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} que indican contaminación con proteínas y compuestos fenólicos, respectivamente. Para esta tesis, consideramos que un ARN es de "*buena calidad*" si las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} mostraban un valor superior a 1,8 y 1,5; respectivamente.

2.4.2 | Retrotranscripción (RT)

Para realizar la RT se partió de 1 µg de ARN total, el cual previamente fue tratado con 0,4 U/µl de DNasa I (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La RT se realizó empleando 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante y en presencia de 200 ng de random primers (Invitrogen), dinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM de cada tipo, 400 U de RNAse Out (Invitrogen) y DTT (Invitrogen) 10 mM en un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción se realizó siguiendo el siguiente programa: 10 min, 25°C; 50 min, 37°C; 15 min, 70°C. El ADNc fue diluido 1/5 en agua ultra pura antes de realizar la PCR en tiempo real (qPCR).

Los ADNc utilizados para la validación de los microarray fueron retrotranscriptos con la enzima SuperScript III según indicaciones del fabricante. El ARN (1 µg) pretratado con DNasa I, se retrotranscribió empleando 200 U de SuperScript III (Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante. La reacción fue realizada en presencia de random primers, dNTPs, RNAse Out y DTT en las mismas concentraciones, volumen final y programa que el detallado para la enzima M-MLV. El ADNc fue diluido 1/5 en agua ultra pura antes de realizar las qPCR.

2.4.3 | PCR en Tiempo Real

La qPCR se realizó empleando kit QuantiTect (QIAGEN) según instrucciones del fabricante, empleando en todos los casos los primers a concentración final de 0.9 µM y 2 µl del ADNc diluido. El protocolo de amplificación se empleó para todos los genes fue el siguiente: 15 min, 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg, 95°C; 1 min, 60°C (paso de adquisición de fluorescencia en el canal verde). Seguidamente se realizó curva de disociación de los productos según el siguiente protocolo: 60-95°C con aumentos de 1°C cada 5 seg, con registro de fluorescencia en cada paso. Las qPCR se realizaron en los termocicladores en tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) o Rotor Gene-6000 (QIAGEN).

Los primers para bovinos y ovinos fueron tomados de la bibliografía o diseñados de *novo* a partir de las secuencias de referencia de los genes de interés, empleando los software Primers Express y Primer3plus. La especificidad de los primers tomados de la bibliografía fue verificada con Primer Express Software y Primer-Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Las

secuencias de todos los primers, y la bibliografía de la cual fueron tomados en el caso que correspondiese, fueron detalladas en el Anexo 1.

Durante la etapa de la puesta a punto de las RT-qPCR (Anexo 2), los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en TBE 1X para confirmar que los amplicones producidos tuvieran el tamaño esperado en pares bases (pb).

El análisis de datos de las PCR se realizó en los programas provistos por los fabricantes de cada termociclador. Posteriormente, los datos se procesaron según el método descrito en (Livak and Schmittgen, 2001). En bovinos fue utilizado el gen de β2M (beta-microglobulina) como gen de referencia endógeno, y en ovinos el gen utilizado fue el de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los resultados se expresan como niveles relativos respecto del grupo control indicado también para cada caso.

2.5 | ENSAYOS DE MICROARRAY

Las respuestas transcripcionales de los bovinos naïve, vacunados, y vacunados protegidos o no protegidos fueron estudiadas mediante microarrays de expresión *Bos taurus* Oligo Microarray *v2* Design ID 023647 4x44K (Agilent).

Los ARN seleccionados para ser analizados fueron re-purificados con el kit ARN Clean-Up (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad fue analizada con el 2100 BioAnalyzer (Agilent), servicio prestado por el Instituto Pasteur Montevideo. Para esta tesis, consideramos que un ARN con RIN (del inglés: *RNA Integrity Number*) de 6 presenta una calidad mínima y suficiente para ser analizado por microarray. Las hibridaciones fueron realizadas por el servicio de Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

El análisis estadístico fue realizado con el software *Ace.Map Creator 1.0* desarrollado por el grupo colaborador del Dr. Arndt Benecke (Institut des Hautes Études Scientifiques & Interdisciplinary Research Institute, Francia). Para el análisis fue utilizado un punto de corte de $p<0,01$ y un logQ (logaritmo del cambio en expresión) sin restricciones. El curado de lista de genes correspondientes a las sondas expresadas diferencialmente fue llevado a cabo sonda por sonda, revisando la lista del array 023647_D_GeneList_20160308 suministrada por Agilent Technologies, Inc. Los genes no descritos fueron deducidos por homología de secuencia con ratón y humano. Para analizar las funciones biológicas o vías metabólicas alteradas fueron utilizadas las bases de datos del Gene Ontology (GO) (http://geneontology.org/), REACTOME (https://reactome.org/) y en la base de datos Pathway Interaction Database (PID) (http://www.ndexbio.org/#/).

2.6 | PREPARACIÓN DE SUEROS

Los sueros analizados en el marco del modelo de enfermedades clostridiales fueron obtenidos a partir de las muestras de sangre colocadas en tubos con gel separador Vacunainer (BD). Los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 min y el suero fue guardado debidamente rotulado a -20°C hasta su utilización en la técnica ELISA.

2.7 | ELISA

Los niveles de anticuerpos séricos contra los diferentes componentes clostridiales incluidos en las vacunas fueron evaluados mediante un ELISA especialmente desarrollado y específico para cada especie de *Clostridium* y para cada especie animal de destino (bovino y ovino).

Brevemente, placas Nunc-Immuno ELISA (Nunc, Dinamarca) fueron sensibilizadas con el antígeno correspondiente de cada especie de *Clostridium*, en la concentración previamente optimizada para cada clostridio (detalladas en la Tabla 2-1) en 100 µl de PBS. Las sensibilizaciones fueron realizadas durante toda la noche (ON) a 4°C, con la excepción del ELISA para *C. hemolyticum* en bovinos que fue incubada 2 h a 37°C. A continuación, las placas fueron lavadas con PBST [0,05% (vol/vol) Tween 20 (Sigma) en PBS] y bloqueadas con 200 µl por pocillo de buffer de bloqueo empleado en cada ELISA (Tabla 2-1) durante 1 h a 37°C.

Cepa clostridial	Ovinos		Bovinos	
	Sensibilizado	Buffer de bloqueo Buffer de dilución de Acs	Sensibilizado	Buffer de bloqueo Buffer de dilución de Acs
C. chauvoei	20 µg/ml	5% LD 0,2% PBST 0,5% LD PBST	60 µg/ml	5% LD 0,2% PBST 0,5% LD PBST
C. hemolyticum	15 µg/ml	3% BSA PBST 1% BSA PBST	10 µg/ml	3% BSA PBST 1% BSA PBS
C. novyi B	10 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBS	2 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST
C. perfringens A	7,5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST	7,5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST
C. perfringens C	20 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST	20 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST
C. perfringens D	15 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST	15 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST
C. septicum	5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST	5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBS
C. sordellii	7,5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST	7,5 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBS
C. tetani	5 µg/ml	5% LD 0,2% PBST 0,5% LD PBST	10 µg/ml	1% BSA PBST 1% BSA PBST

Tabla 2-11. Condiciones de sensibilizado y Sistema de buffers de los ELISAs específicos para cada clostridio y especie animal. PBST: 0,05 % Tween 20 en PBS. LD: leche descremada en polvo (Conaprole).

Para cada ELISA específico, se preparó una curva estándar con 10 diluciones seriadas al medio usando un pool de sueros de bovinos u ovinos vacunados tomados a los 36 dpv. Los sueros problema fueron analizados en 6 diluciones seriadas al ¼ de manera de considerar la variabilidad del título de anticuerpos entre animales y los distintos tiempos analizados. Todas las diluciones fueron realizadas en el buffer de dilución correspondiente para cada ELISA (Tabla 2-1). Seguidamente, la curva estándar y los sueros problema (100 µl/pocillo) fueron sembrados por duplicado e incubados durante 2 h a 37°C, con la excepción de *C. novyi* tipo B que se incubó ON a 4°C. A continuación, se incubaron con 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario correspondiente a cada especie animal: anti-Sheep IgG HRPO conjugated (Cat. N A 3415, Sigma) o anti-Bovine IgG HRPO conjugated (Cat. N A 5295, Sigma) en una dilución 1/3000 o 1/5000 en el buffer de dilución de anticuerpos (Tabla 2-1), respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 h. El revelado fue realizado con 100 µl/pocillo del buffer sustrato (SIGMAFAST™ OPD Tablet set, P9187) en oscuridad durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 30 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2 M. Los valores de densidad óptica se midieron a 492 nm en un lector de microplacas ELISA (Dynex Technology).

Para titular la respuesta de anticuerpos, a cada dilución de las curvas estándares específicas les fue asignada un valor en unidades arbitrarias (UA). Para el cálculo del título fueron elegidas 3 diluciones de cada suero problema de manera que sus valores de DO quedaran incluidos dentro del rango de linealidad la curva estándar. Éstos valores de OD fueron interpolados en la curva estándar, y los valores de título en UA/ml fueron promediados y calculados el DS y el CV, en este caso el CV intraensayo fue menor al 15%.

Para estandarizar los ensayos se definió que para aceptar los resultados de una placa: 1) la pendiente de la curva estándar debe quedar incluido dentro del valor promedio de todas las curvas estándar +/- 2 desviaciones estándar (DS); y 2) el coeficiente de variación (CV) de todas las pendientes debe ser menor al 20%.

2.8 | CITOMETRIA DE FLUJO

Finalizada la estimulación *in vitro* de los PBMC, las células fueron marcadas con anticuerpos para detectar las principales poblaciones celulares linfocitarias (linfocitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ y linfocitos B). El panel de anticuerpos utilizado fue: CD4_PE (células T $CD4^+$), CD8_Alexa 647 (células T $CD8^+$) y CD22_biot_PECy7 (células B) (AbD Serotec). Brevemente, los PBMC fueron cosechados de las placas de cultivo, centrifugados a 300 g por 3 min y resuspendidos en FACS buffer (PBS, 1% BSA, 0,1% NaN3 y 2,5 mM EDTA) a una densidad de $1x10^6$ células en 20 µl. Seguidamente, los leucocitos fueron marcados con el panel de anticuerpos primarios por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad (2 µl de anticuerpo para $1x10^6$ células/20 µl). En particular, CD22_Biotina requiere un segundo marcado con streptavidina que se realizó durante

30 min en iguales condiciones que la marcación con los anticuerpos primarios. Luego de dos lavados con FACS buffer se realizó la adquisición en FACSCanto II (BD Biosciences) y la estrategia de análisis y jerarquía de poblaciones se indica en cada caso. En algunas ocasiones las células se fijaron con paraformaldehído 1,125% por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y tras ser lavadas se almacenaron a 4°C hasta el momento la adquisición. Las diferencias estadísticas se calcularon aplicando el test no paramétrico de Mann Whitney y diferencias con $p<0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

2.9 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Para comparación entre dos grupos se empleó test de Mann-Whitney de dos vías, mientras que para la comparación de más de dos grupos se realizó el Test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunns. Para analizar la correlación entre los niveles relativos de ARNm de IFN-γ y el título de anticuerpos contra FMDV fue calculado el coeficiente de Pearson. Los análisis se realizaron para *$p<0.05$, $p<0.01$ y $p<0.001$* y se indican con uno, dos o tres asteriscos respectivamente.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 FIEBRE AFTOSA

3.1.1 | ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para avanzar en la definición de marcadores moleculares asociados a la respuesta inmune inducida por la vacunación y protección contra la fiebre aftosa decidimos comparar las respuestas transcripcionales de bovinos naïve, vacunados, y vacunados y desafiados. Para ello, en una primera instancia se optimizaron las técnicas para evaluar la respuesta transcripcional específica contra el antígeno de FMDV. Posteriormente, analizamos el perfil de expresión génica de citoquinas en un intento de definir posibles marcadores específicos que nos permitieran diferenciar entre los distintos grupos. Finalmente, en función de esos datos se seleccionaron animales de los distintos grupos para evaluar su respuesta transcripcional global por microarray.

Esta aproximación experimental fue enmarcada en el proyecto Biotecsur *"Aplicación de la genómica funcional y otras herramientas biotecnológicas para el desarrollo y control de vacunas contra el virus de la fiebre aftosa"* (Referencia UE 127117). El consorcio Biotecsur estuvo conformado por socios de Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay, nuestro grupo de investigación fue socio coordinador. Uno de los socios argentinos, fue una de las principales empresas productoras de vacunas contra la fiebre aftosa de América del Sur. La empresa, como parte de sus rutinas de control de producción, realiza pruebas de eficacia y potencia contra FMDV, y en este marco nos proporcionó muestras de sangre de bovinos sin vacunar (naïve) y vacunados contra la fiebre aftosa. Dichas pruebas fueron realizadas en Argentina donde la empresa tiene su planta de producción. Argentina está declarado por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) como país libre de fiebre aftosa, y presenta dos zonas delimitadas por el paralelo 42, una libre sin vacunación y la otra libre con vacunación (OIE, 2019). Uruguay está declarado por la OIE como libre con vacunación (OIE, 2019), y presenta, a diferencia de Argentina, la prohibición legal por el Decreto 261/994 de manipular el FMDV, con cualquier fin, en todo el territorio uruguayo (Presidencia de la República Oriental del Uruguay, 1994).

En este contexto, nos encontramos con la dificultad de no poder realizar el trabajo experimental en nuestro país, y por tanto debimos trasladarnos a Argentina, en reiteradas ocasiones durante el transcurso del proyecto, para llevarlo a cabo. El trabajo experimental fue realizado en dos etapas, la primera fue realizada en la ciudad de Buenos Aires en el Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, dirigido por el Dr. Osvaldo L. Podhajcer, de la Fundación Instituto Leloir (FIL) y miembro del consorcio, donde recibimos las muestras de sangre, las estimulamos *in vitro* con antígeno de FMDV, y luego las inactivamos sin afectar la integridad del ARN.

Posteriormente, trasladamos las muestras a nuestro laboratorio donde se extrajo el ARN y realizamos las RT-qPCR o los ensayos de microarray.

En función de las dificultades para realizar el trabajo experimental, debimos establecer una logística que nos permitiera obtener las muestras, asegurar la calidad de la sangre, la integridad del ARN extraído, su transporte, y nos permitiera analizar las respuestas transcripcionales. Para ello, se trabajó en 3 puntos clave que se describen a continuación.

3.1.1.1 | Optimización de técnicas y protocolos

La primera etapa del trabajo experimental fue la optimización de las técnicas y protocolos que nos permitieran evaluar los perfiles de expresión génica y la respuesta transcripcional global en muestras de sangre de bovino.

En este contexto, nos planteamos como hipótesis que la expresion del ARNm de IFN-γ, en respuesta a la estimulación de la sangre con el antígeno de FMDV, podía ser utilizada como marcador de vacunación. La relación entre el IFN-γ y la inmunidad contra FMDV ha sido ampliamente reportada, y como se detalla en la Introducción, diferentes publicaciones han adjudicado un rol importante al IFN-γ en la actividad antiviral contra FMDV (Carr et al., 2013; Diaz-San Segundo et al., 2010; Moraes et al., 2007; Oh et al., 2012; Parida et al., 2006; Zhang et al., 2002). Partiendo de esta hipótesis como cierta, utilizamos además la expresión de IFN-γ tanto para optimizar las técnicas y protocolos, como para evaluar si el sistema de trabajo planteado (estimulación con el antígeno presente en la vacuna) y el antígeno utilizado eran los correctos para diferenciar los bovinos naïve de los vacunados y protegidos contra FMDV.

Para la puesta a punto fue utilizada sangre de bovinos mantenidos en el campo experimental del Instituto de Higiene o sangre de bovinos provenientes de pruebas de potencia o eficacia realizadas por la empresa colaboradora en Argentina.

Para establecer los protocolos se abordaron los siguientes puntos:

a) Optimizar los protocolos de RT-qPCR para analizar la expresión de ARNm de citoquinas
b) Evaluar donde estudiar la respuesta transcriptómica (sangre o PBMC)
c) Seleccionar un antígeno de FMDV capaz de estimular una respuesta específica
d) Definir la concentración óptima para estimular las muestras de sangre
e) Definir el tiempo de estimulación, según cinética de niveles relativos de ARNm
f) Evaluar el efecto del transporte de la sangre
g) Evaluar el efecto del anticoagulante sobre las qPCR
h) Evaluar diferentes métodos específicos para la extracción de ARN a partir de sangre

La puesta a punto de las técnicas se describe en forma detallada en el *Anexo 2*.

3.1.1.2 | Transporte de las muestras de sangre

Al inicio del trabajo experimental, uno de los puntos críticos a considerar fueron las condiciones (tiempo y temperatura) del transporte de las muestras de sangre al FIL (Buenos Aires) desde los sitios donde la empresa colaboradora realizó sus pruebas de potencia y eficacia (Campo Experimental Colonia 25 de Mayo del SENASA, provincia de La Pampa, o INTA Castelar, provincia de Buenos Aires, respectivamente). Ambas pruebas fueron descritas en Introducción (Sección 1.2.3.1) y en la Sección 2.1.1 (M&M).

Durante la fase de la puesta a punto de las técnicas (Sección 3.1.1 y Anexo 2) evaluamos el efecto de las condiciones de transporte de la sangre en el perfil de expresión génica, y determinamos que el tiempo de transporte afecta la expresión del ARNm de IFN-γ. Observamos que la sangre fresca (esto es con 4 h de extraída) indujo mayores niveles de expresión de IFN-γ en respuesta a la estimulación antigénica, en comparación con la sangre con 24 h de extraída (sangre conservada). Este resultado nos llevó a concluir que debíamos utilizar sangre con 4 h de extraída para analizar el perfil de expresión génica de citoquinas y la respuesta transcripcional.

No obstante, es importante aclarar que no siempre fue posible contar con sangre con pocas horas de extraída, principalmente al comienzo del trabajo experimental, por lo que para esta tesis siempre que mencionamos "*muestras de sangre*" nos referimos a sangre fresca. Cuando analizamos sangre conservada realizamos la aclaración pertinente.

3.1.1.3 | Ensayos de vacunación/desafío contra FMDV

En función de los resultados sobre los efectos del transporte en el perfil de expresión génica, nos centramos en pruebas de eficacia que nos permitían procesar la sangre con 4 h de extraída, dado que las sangrías fueron realizadas en Buenos Aires. La empresa colaboradora evalúa la eficacia de sus nuevas vacuna contra FMDV mediante el test PPG (del inglés *Protection against Podal Generalization*) que es la prueba "*gold standard*" a nivel internacional (OIE, 2018a) (Sección 1.2.3.1). Este test evalúa, en animales vacunados y control, la presencia de lesiones podales inducidas por el desafío con el virus de FMDV (Sección 2.1.1, M&M).

Las muestras de sangre analizadas en esta tesis siempre fueron extraídas previas al desafío, debido a que la reglamentación establecida por el SENASA no nos permitió sangrar los animales luego de ser desafiados con el virus vivo. A partir de dichas muestras obtenidas, la empresa colaboradora tituló los anticuerpos específicos contra FMDV, y nosotros analizamos el perfil de expresión génica o la respuesta transcripcional global frente al antígeno de FMDV (Secciones 2.4 y 2.5, M&M).

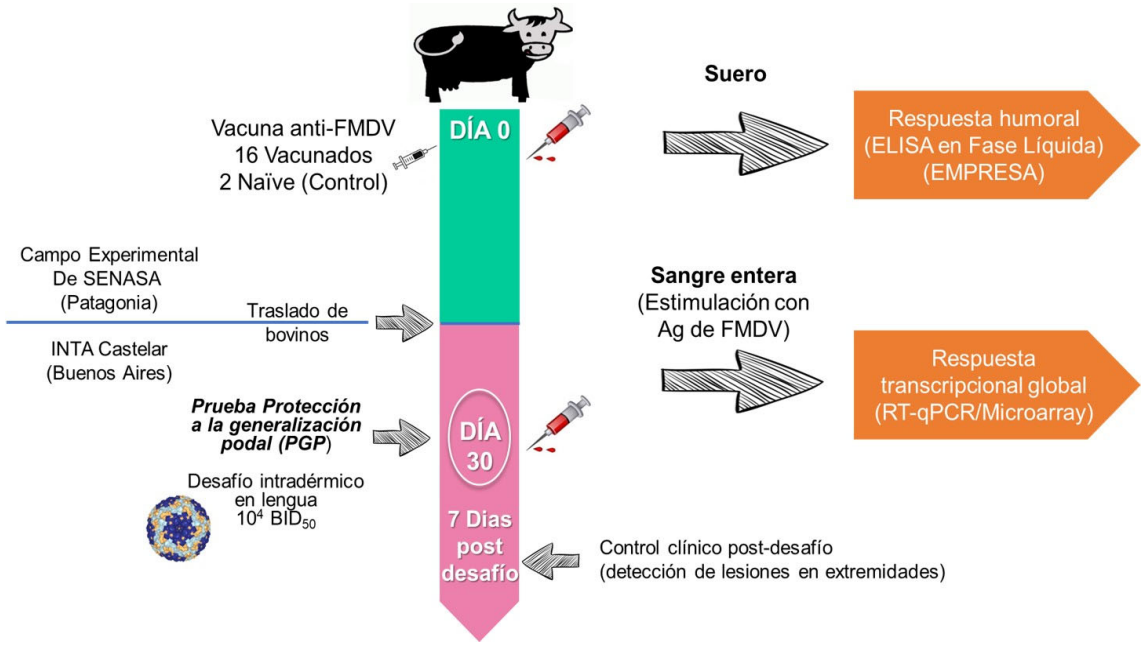

Figura 3-1. Esquema de ensayos de eficacia de la vacuna contra FMDV.

Por otra parte, nos focalizamos en pruebas donde el desafío fue realizado a los 30 dpv, considerando que había sido reportado que en la mayoría de los animales es observada la inducción de la respuesta inmune a 14 dpv (Maradei et al., 2008). El test PPG por reglamentación se realiza a los 90 dpv, sin embargo para ciertas vacunas experimentales estos ensayos se realizan a 30 dpv (Maradei et al., 2008; OIE, 2018a).

En la figura 3-1 se representa un esquema de los tres ensayos de vacunación y desafío (Experimentos N° 7, 8 y 10) que analizamos en esta tesis. El Exp. 7 fue un ensayo de eficacia heterólogo (vacunación monovalente con O1 Campos y desafío con el serotipo O Corrientes), y por ello fue considerado exclusivamente para comparar animales vacunados *vs* naïve. De este ensayo accedimos a muestras de sangre de 6 de los 16 animales vacunados y de los 2 naïve. Los experimentos 8 y 10 fueron útiles para analizar tanto la respuesta a la vacunación como a la protección inducida por la vacuna. El Exp. 8 fue un ensayo de eficacia homóloga (vacunación monovalente con O1 Campos y desafío con el mismo serotipo), y accedimos a las muestras de sangre de todos los bovinos. El Exp. 10 fue un ensayo de eficacia con la vacuna tetravalente (los serotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 y C3 Indaial) que se utiliza actualmente en las campañas contra la fiebre aftosa, y el desafío fue con O1 Campos. Del Exp.10 accedimos a las muestras de 17 animales vacunados y 2 controles.

3.1.2 | ELECCIÓN DE BIOMARCADORES VACUNACIÓN CONTRA FMDV POR RT-qPCR

3.1.2.1 | Análisis del perfil de expresión génica de citoquinas

Para definir biomarcadores asociados a la vacunación efectiva evaluamos la expresión de citoquinas representativas del repertorio de células T (IFN-γ, IL-17, IL-4 e IL-10) fueron utilizados los protocolos optimizados (Anexo 2) y detallados en la Sección 2.3 y 2.4 (M&M). Para ello, la sangre entera de cada animal fue estimulada *in vitro* con antígeno de FMDV (preparado por la empresa colaboradora). Finalizada la estimulación, los eritrocitos fueron lisados, y los PBL fueron colocados en TRIzol, y posteriormente trasladados a nuestro laboratorio en Uruguay, donde se realizaron las RT-qPCRs.

La determinación de los niveles de mensajeros de las citoquinas fueron calculados con el método de ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001). Para cada muestra, se calculan los niveles relativos del ARNm en estudio, normalizando contra los niveles del gen β2M (gen de referencia endógeno) y relativizando contra la condición control sin estimular (PBS).

Por otra parte, los niveles de expresión del ARNm de β2M fueron utilizados como control del proceso (la extracción de sangre, estimulación *in vitro*, extracción y cuantificación del ARN, RT-qPCR). Para ello, se compararon los valores Ct de β2M de diferentes ADNc, preparados en un mismo Mix de qPCR. Las muestras fueron consideradas aceptables si cumplían con dos condiciones: 1) valores de Ct adecuados (amplificación de β2M cercana al ciclo 17), y 2) si la oscilación de los valores de Ct dentro del mismo ensayo no era mayor a ± 1 ciclo. En estas condiciones, se consideró que todo el proceso funcionó adecuadamente, y se continuó con el análisis del perfil de citoquinas. Además, estos valores de Ct de β2M fueron utilizados para comprobar que en la condición de estudio (estimulación con el antígeno) no variaba los niveles de expresión respecto a la condición calibradora (PBS), condición para un buen gen de referencia endógeno y pre-requisito para aplicar el método de ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001). A modo de ejemplo, en la figura 3-2 mostramos los valores de Ct de β2M en muestras provenientes de dos ensayos de eficacia (Exp. 7 y 8) estimuladas *in vitro* en forma individual con antígeno de aftosa o PBS. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en los valores de Ct por lo cual es posible

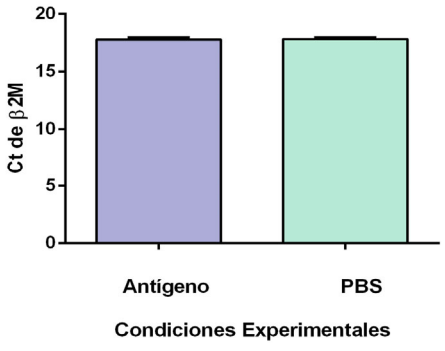

Figura 3-2. Ct para β2M de muestras de sangre bovina provenientes de los ensayos Exp 7 y 8, del grupo estimulado con antígeno y del grupo sin estimular (PBS). Los resultados muestran la Media ± SEM (n= 26)

utilizar el método de Livak.

En todos de los experimentos realizados, las muestras de sangre de todos los bovinos fueron incubadas con ConA (control positivo) y con PBS (control negativo). Ambos controles fueron empleados para controlar la correcta estimulación, donde el resultado esperado sería que en el control positivo se indujera la expresión del ARNm de IFN-γ y que en el control negativo esto no se dé. En la figura 3-3 se muestran los resultados de la cuantificación del ARNm de IFN-γ de un experimento que anduvo correctamente ya que los controles del proceso dieron lo esperado. La estimulación con ConA indujo un aumento en la expresión del ARNm de esta citoquina en muestras de sangre tanto de animales naïve como animales vacunados en relación a la condición control (PBS).

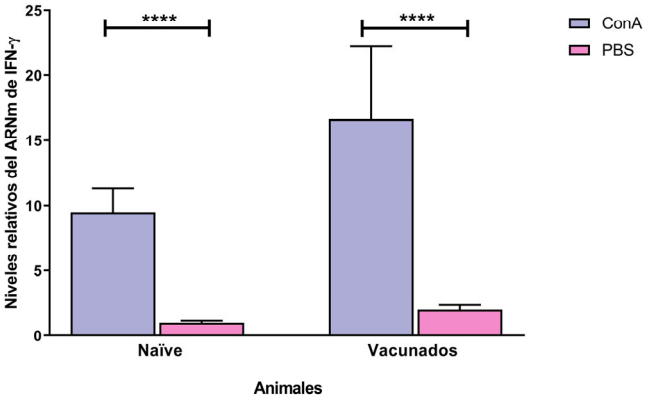

Figura 3-3. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en sangre entera de animales vacunados y naïve. Los resultados indican la Media ± SEM de los niveles relativos de ARNm de IFN-γ normalizados respecto a B2M y relativos al grupo al grupo control animales naïve sin estimular (PBS). Test Mann-Whitney, ****: $p< 0.0001$.

3.1.2.1.1 │Expresión del ARNm de IFN-γ

La expresión de esta citoquina fue cuantificada en todos los ensayos de vacunación analizados durante esta tesis. A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación en tres ensayos de vacunación Exp 7, 8 y 10 (Fig. 3-4A, 3-4B y 3-4C, respectivamente). En los tres experimentos se observó que la expresión del ARNm de IFN-γ fue inducida en todos los bovinos vacunados en respuesta al antígeno, mientras que en los animales naïve este efecto no se observó. Sin embargo, la expresión de esta citoquina mostró una importante variabilidad intergrupal e interensayo. Considerando que, sólo contamos con dos bovinos control por cada ensayo, para evaluar la significancia del aumento de expresión del ARNm de IFN-γ, debimos agrupar en vacunados y naïve los animales de tres experimentos. El resultado mostró que en los bovinos vacunados (n=38) se indujo un aumento antígeno específico de la expresión de IFN-γ con respecto a los bovinos sin vacunar (n=6) (Fig. 3-4D).

Este aumento en la expresión del IFN-γ se observó en animales vacunados de todos los ensayos, tanto en los que se empleó sangre fresca como conservada. En tanto que, los animales que no habían sido vacunados no mostraron en ningún caso respuesta al antígeno, demostrando que la respuesta observada es específica al antígeno de FMDV utilizado. De este modo, confirmamos la hipótesis inicial sobre la expresión de esta citoquina puede ser utilizada como marcador de vacunación en nuestro sistema de trabajo.

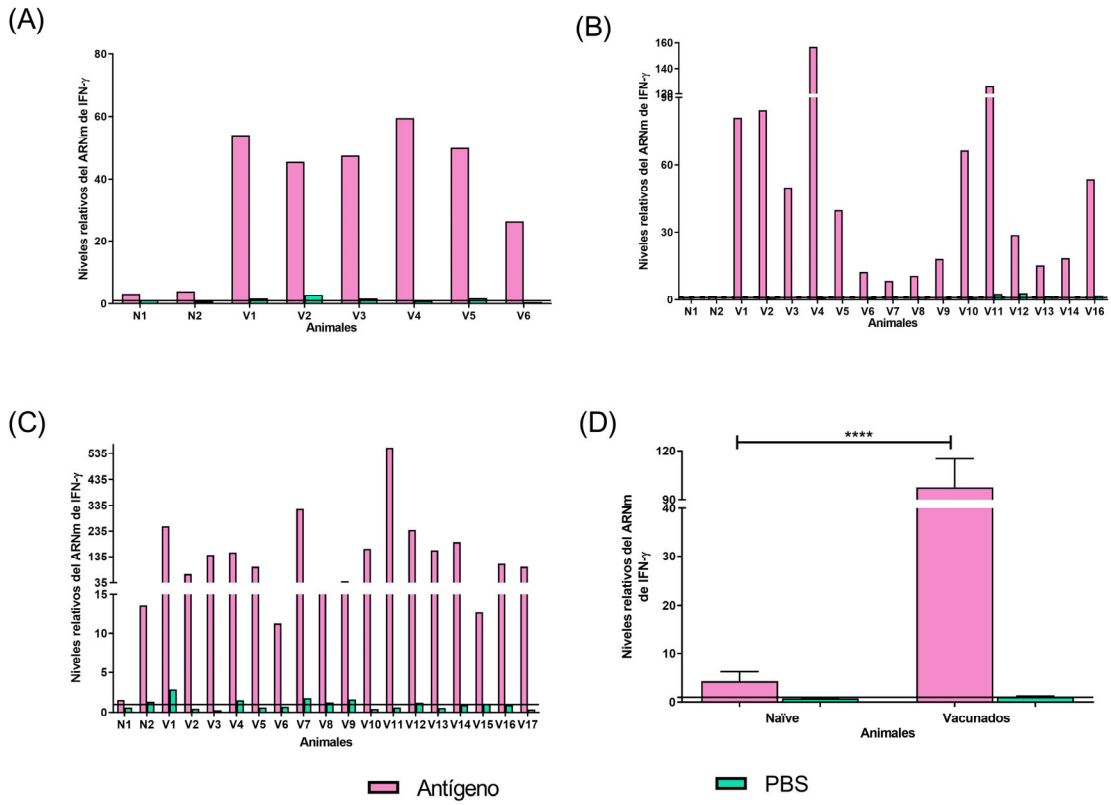

Figura 3-4. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en animales vacunados y naïve a los 21 dpv. Los niveles de ARNm fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMVD (barras rosadas) o sin estimular (PBS) (barras verdes). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como los niveles relativos al comparar con el promedio de las muestras sin estimular (PBS). En (A), (B) y (C) se muestran los niveles de expresión de los bovinos Naïve (N) y vacunados (V) de los Exp. 7, 8 y 10. En (D) los resultados indican la Media ± SEM de los niveles relativos en respuesta al antígeno de FMV y al PBS en los bovinos vacunados (n=38) y naïve (n=6) de los ensayos de (A), (B) y (C). En todos los gráficos la línea trazada (n=1) corresponde al promedio de los niveles relativos IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS). Test Mann-Whitney, ****: $p < 0.0001$.

Además, se evaluó si la expresión del ARN de IFN-γ podría ser marcador de protección asociada a la vacunación contra el desafío con FMDV, y para ello, nos centramos en los ensayos de vacunación/desafío homologos (Exp. 8 y 10). Dividimos los bovinos vacunados en protegidos y no protegidos, de acuerdo a los datos clínicos post-desafío suministrados por la empresa, y comparamos los niveles de expresión del IFN-γ. En el Exp. 8 se observó que los protegidos expresaron niveles mayores de esta citoquina que los no protegidos (Fig 3-5A). En cambio, en el Exp. 10 no se obsevó una diferencia significativa entre los dos grupos, aunque pudo observarse una tendencia similar a la del Exp. 8 (Fig.3-5B). En suma, nuestros resultados nos podrían estar sugiriendo que la expresión del ARNm de IFN-γ en respuesta al antígeno de FMVD podría ser utilizada como marcador de protección inducida por la vacunación.

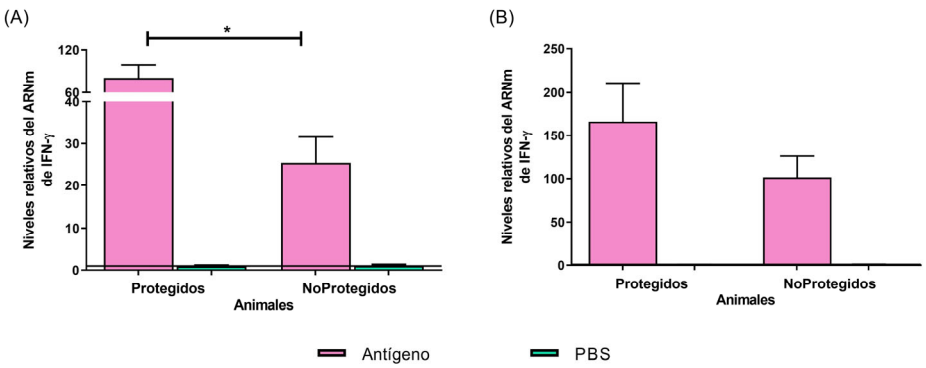

Figura 3-5. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en animales vacunados protegidos y vacunados no protegidos. Los niveles de expresión fueron cuantificados a los 30 dpv (previo al desafío), y con los datos clínicos del desafío, a los 7 días de la inoculación, los bovinos vacunados fueron agrupados en protegidos y no protegidos. Los niveles de ARNm fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMVD (barras rosadas) o sin estimular (PBS) (barras verdes). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como los niveles relativos respecto al promedio de las muestras sin estimular (PBS). En los gráficos se muestran la Media ± SEM de los niveles relativos en respuesta al antígeno de FMV y al PBS de los bovinos vacunados protegidos y no protegidos de los Exp. 8 (A) y 10 (B). En todos los gráficos la línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS). Test Mann-Whitney entre protegidos y no protegidos, *: $p< 0.05$.

3.1.2.1.2 │Expresión del ARNm de IL-17

Los diferentes ensayos analizados mostraron que todos los animales vacunados responden frente a la estimulación antigénica expresando IL-17. Los bovinos no vacunados también expresaron esta citoquina, pero los niveles fueron similares a los observados en los animales vacunados. En suma, la expresión del ARNm de IL-17 no sería un buen marcador de vacunación contra FMDV (Fig. 3-6).

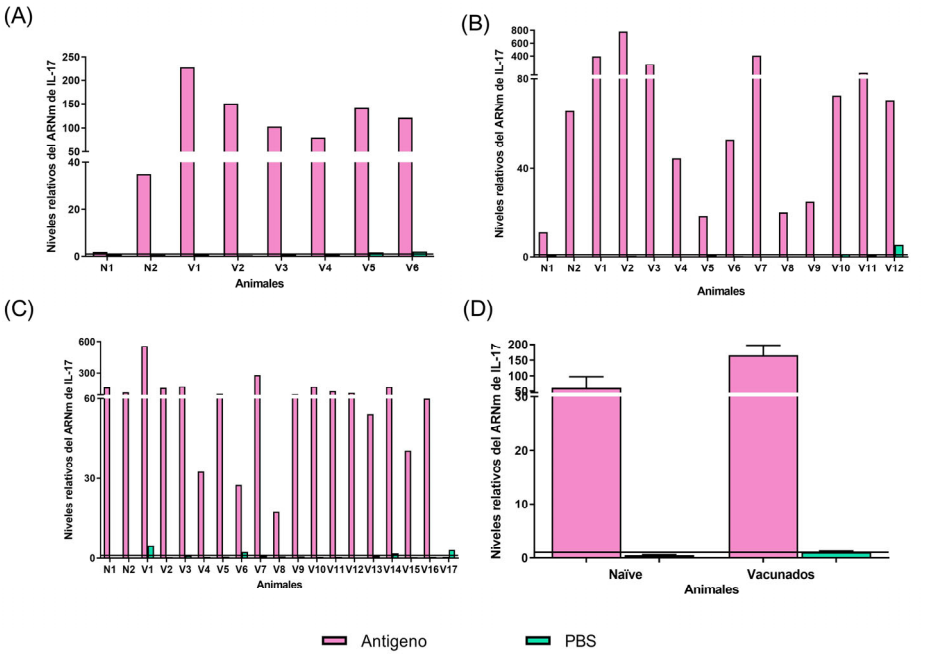

Figura 3-6. Niveles relativos del ARNm de IL-17 en animales vacunados y naïve a los 30 dpv. Los niveles de ARNm fueron determinados en cultivos de sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMVD o sin estimular (PBS) (barras rosadas y verdes, respectivamente). Los niveles de ARNm de IL-17 en cada muestra fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como el nivel relativo respecto al promedio de las muestras sin estimular (PBS). En (A), (B) y (C) se muestran los niveles en los bovinos Naïve (N) y vacunados (V) de los Exp. 7, 8 y 10. En (D) los resultados indican la Media ± SEM de los niveles relativos en respuesta al antígeno de FMV y al PBS en los bovinos vacunados (n=35) y naïve (n=6) de los ensayos de (A), (B) y (C). La línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IL-17 de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS).

3.1.2.1.3 │Expresión del ARNm de IL-4

La estimulación con el antígeno de FMDV no indujo la expresión de esta citoquina diferencialmente en bovinos vacunados respecto a los naïve, asumiendo así que esta citoquina no está asociada a la respuesta a las vacunas contra FMDV y por tanto no es un marcador de vacunación (Fig. 3-7).

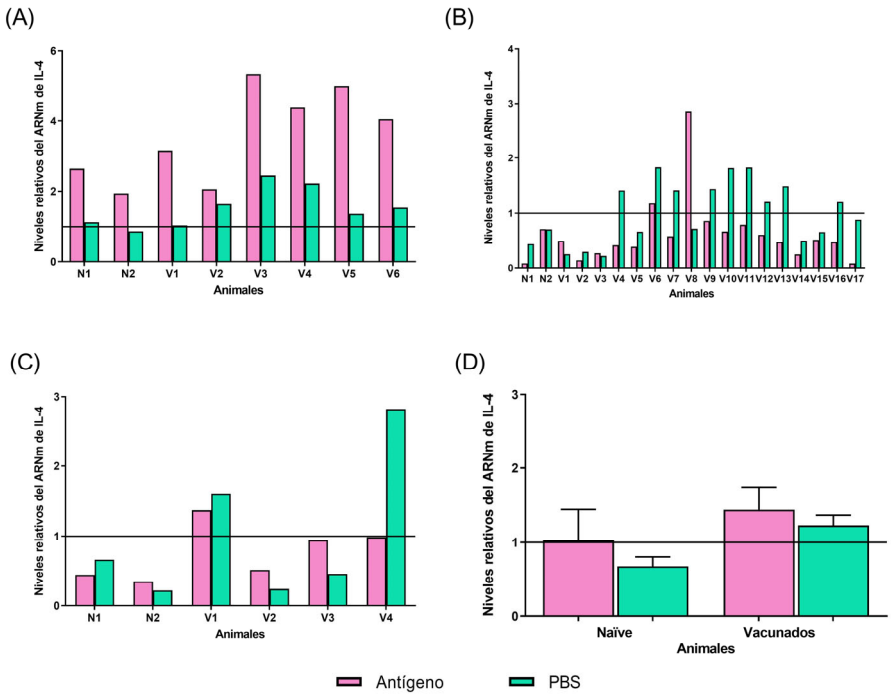

Figura 3-7. Niveles relativos del ARNm de IL-4 en animales vacunados y naïve a los 30 dpv. Los niveles de ARNm fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMV (barras rosadas) o PBS (barras verdes) Para cada muestra, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como los niveles relativos respecto al promedio de las muestras sin estimular (PBS). En (A), (B) y (C) se muestran los resultados de animales Naïve (N) y animales vacunados (V) de los Exp. 7, 8 y 10. En (D) los resultados indican la Media ± SEM del nivel relativo en respuesta al antígeno de FMV y al PBS en los bovinos vacunados (n=27) y naïve (n=6) de los ensayos de (A), (B) y (C). En todos los gráficos la línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IL-4 de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS).

3.1.2.1.4 │Expresión del ARNm de IL-10

La expresión del ARNm de IL-10 fue tambien cuantificada en diferentes ensayos de vacunación (Fig. 3-8A, 3-8B y 3-8C), observándose que en animales vacunados hay una mayor expresión del ARNm de IL-10 post-estimulación con antígeno, respecto a los animales sin vacunar (Fig. 3-8D). Sin embargo, la respuesta de IL-10 mostró una importante variación interensayo tanto el grupo de vacunados como naïve, a diferencia de IFN-γ donde solo se observaba esta variación en el grupo vacunados.

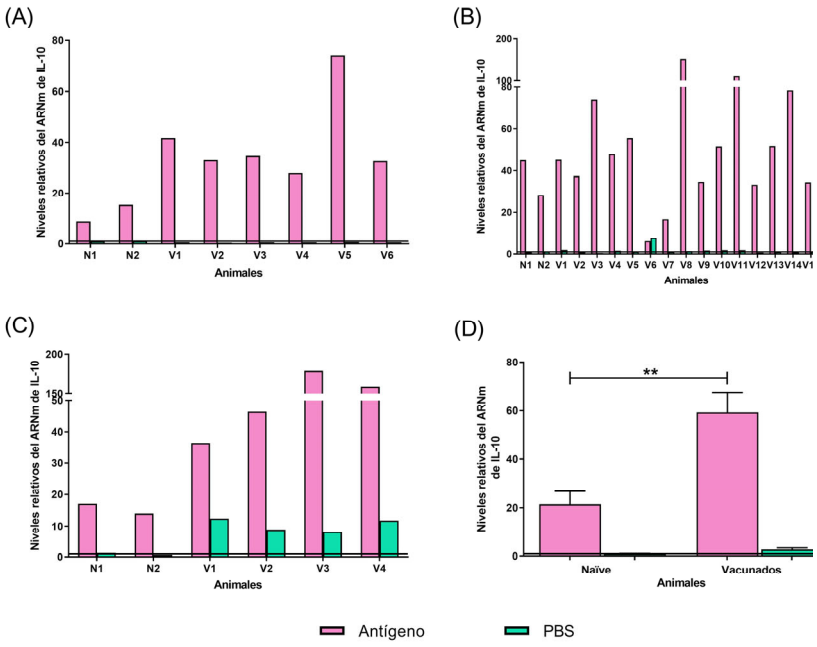

Figura 3-8. Niveles relativos del ARNm de IL-10 en animales vacunados y naïve a los 30 dpv. La expresión del ARNm fue determinada en cultivos de sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMVD (barras rosadas) o PBS (barras verdes) Para cada muestra, los niveles de ARNm de IL-10 fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como los niveles relativos respecto al promedio de las muestras sin estimular (PBS). En (A), (B) y (C) se muestran los resultados de animales Naïve (N) y animales vacunados (V) de los Exp. 7, 8 y 10. En (D) los resultados indican la Media ± SEM del nivel relativo en respuesta al antígeno de FMV y al PBS en los bovinos vacunados (n=27) y naïve (n=6) de los ensayos de (A), (B) y (C). En todos los gráficos la línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IL-10 de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS). Test Mann-Whitney, **: $p< 0.01$

3.1.2.2 | Correlación entre la expresión de ARNm IFN-γ y la serología

La respuesta inmune mediada por anticuerpos es considerada el factor más importante en conferir protección contra FMDV. De hecho, como se mencionó anteriormente, la medición de la potencia de las vacunas se basa en la evaluación de la respuesta serológica inducida por la vacunación. Por otro lado, nosotros pudimos confirmar que la expresión del ARNm de IFN-γ sería un buen marcador de vacunación (Fig. 3-4). Además, observamos una tendencia clara a asociar la expresión de esta citoquina con la protección inducida por la vacuna (Fig. 3-5). En consecuencia, decidimos evaluar si existe una correlación entre los niveles de expresión del IFN-γ y la respuesta humoral en estos animales.

Para esto, fue calculado el coeficiente de Pearson sobre los datos de los niveles relativos de ARNm de IFN-γ y el título de anticuerpos contra FMDV (Fig.3-9), utilizando los datos de los Exp. 7, 8 y 10, de los cuales contábamos con la serología (datos cedidos por la empresa

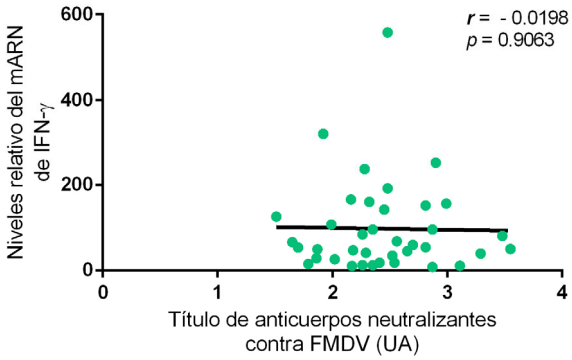

Figura 3-9. Correlación entre los niveles del ARNm de IFN-γ y el título de anticuerpos específico contra FMDV. Los datos (n=38) corresponden a los bovinos de los Exp. 7, 8 y 10. En el gráfico se muestra la curva de la regresión lineal, el Coeficiente de Pearson (r) y el valor de *p* del test.

colaboradora). Nuestro resultado reveló que no existe correlación entre ambos parámetros inmunológicos (coeficiente de correlación de Pearson [*r*]=0,01141; *p*=0,9465).

Considerando que este resultado y que los tres experimentos (7, 8 y 10) fueron diferentes, decidimos analizar en forma individual los Exp. 8 y 10, observándose que, en ambos experimentos, los niveles de anticuerpos fueron similares entre los bovinos vacunados protegidos y no protegidos (Figuras 3-10A y 3-10C). El análisis por experimento tampoco mostró correlación entre la respuesta de anticuerpos y los niveles de expresión del IFN-γ (Figuras 3-10B y 3-10D).

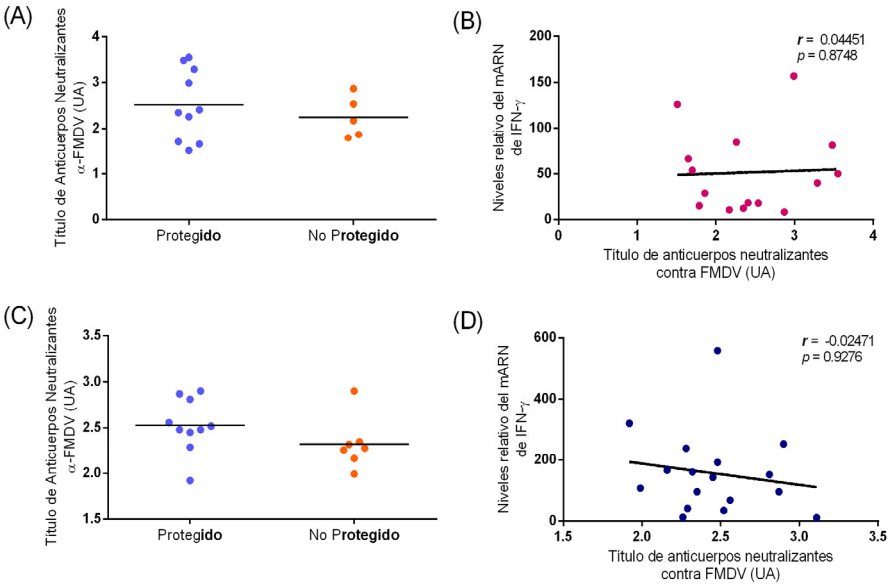

Figura 3-10. Respuesta de anticuerpos α-FMDV en bovinos vacunados y desafiados de los Exp. 8 y 10, y su correlación con los niveles del ARNm de IFN-γ. En (A) y (C) se muestran los títulos de anticuerpos α-FMDV de los bovinos vacunados protegidos y no protegidos de los Exp. 8 y 10, respectivamente. En (B) y (D) se muestra la curva de la regresión lineal, el Coeficiente de Pearson (r) y el valor de *p* del test de los animales vacunados de los Exp 8 y 10, respectivamente.

3.1.3 | "*FIRMA MOLECULAR*" ASOCIADA A LA VACUNACIÓN CONTRA FMDV

Para identificar biomarcadores de protección evaluamos la respuesta transcripcional global frente a la vacunación utilizando dos estrategias experimentales:

a) Identificar genes diferencialmente expresados en respuesta a la vacunación comparando bovinos vacunados *vs* bovinos sin vacunar (naïve) a los 30 dpv.

b) Identificar genes diferencialmente expresados asociados a la vacunación efectiva previo al desafío (30 dpv), comparando la respuesta de animales vacunados que resultaron posteriormente protegidos frente al desafío respecto a los que no lo fueron.

Las respuestas transcripcionales fueron estudiadas mediante microarrays de expresión de bovinos (Sección 2.5, M&M). Las hibridaciones fueron realizadas por el servicio de Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. El análisis estadístico fue realizado por el colaborador Dr. Arndt Benecke del Institut des Hautes Études Scientifiques & Interdisciplinary Research Institute de Francia. Para el análisis fue utilizado un punto de corte de $p<0,01$ y un logQ (logaritmo del cambio en expresión) sin restricciones. La lista de sondas expresadas diferencialmente fue curada revisando la lista del array utilizado y los genes no descritos fueron deducidos por homología de secuencia con ratón y humano.

La selección de los posibles candidatos para integrar la "*firma molecular*" fue realizada considerando los siguientes puntos: 1) que fueran genes expresados diferencialmente (DEG); 2) que surgieran en ambos microarray; y 3) que tuvieran relevancia inmunológica en nuestro modelo experimental.

Para relevar las funciones biológicas o vías metabólicas que se encontraran alteradas y así poder identificar posibles candidatos para integrar la "*firma molecular*", realizamos test de enriquecimiento utilizando los genes diferencialmente expresados entre ambos grupos de microarrays. Los test de enriquecimiento fueron realizados, en colaboración con los Dres. Juan Martín Marqués y Andrés Iriarte, utilizando la base de datos del GeneOntology (GO). El GO permite determinar cuáles procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares están sobre o sub-representadas en un grupo de genes. Identifica genes utilizando la librería de PANTHER, donde a cada gen se le asigna un "*Gene ID*" que se compone del nombre del organismo, del código de ENSEMBL de la secuencia genómica, y del código de UniProtKB de la secuencia proteica. El test calcula estadísticamente el porcentaje de genes enriquecidos en una categoría determinada (llamada "*término GO*"), que está sobre o sub-representada en el conjunto de genes evaluados, en relación con un conjunto de genes de referencia, más allá del azar. Como genes de referencia utilizamos el genoma completo de *Bos taurus*. Para analizar las vías metabólicas enriquecidas se utilizó el REACTOME, que es una base de datos curada de vías y reacciones en biología humana, que asume por comparación con el genoma humano, las posibles funciones de genes y la posible participación de éstos en redes biológicas y vías metabólicas. Los resultados de las funciones biológicas o vías metabólicas son mostrados en el Anexo 4.

A continuación, los resultados serán presentados por comparación Vacunados *vs* Naïve y por comparación Protegidos *vs* No Protegidos (animales vacunados). Finalmente, se detallan los resultados de la selección de la "*firma molecular*".

3.1.3.1 | Comparación Vacunados *vs* Naïve

3.1.3.1.1 | Selección de los bovinos

Los ARNs de bovinos que se destinarían a estudiar respuesta transcripcional fueron seleccionados de los Exp. 7 y 8, los cuales fueron descritos en la Sección 3.1.3. Brevemente, el Exp. 7 fue un ensayo de eficacia heterólogo por lo cual sólo fue considerado para comparar animales vacunados *vs* animales naïve a los 30 dpv, mientras que el Exp. 8 fue un ensayo de eficacia homóloga por lo que pudimos considerarlo para realizar las dos comparaciones.

A lo largo del trabajo experimental nos enfrentamos al gran desafío de tener que agrupar muestras de diferentes experimentos, dado que los ensayos de vacunación/desafío incluyen únicamente 2 animales naïve o sin vacunar, y tal número es insuficiente para realizar análisis estadísticos. En consecuencia, para comparar las respuestas transcripcionales por microarray agrupamos animales de los Exp 7 y 8 de manera de incluir 4 animales vacunados (2 de cada experimento) y 4 naïve (2 de cada experimento). Para ello, valoramos mediante la expresión del ARNm de IFN-γ si los animales vacunados o naïve, de ambos experimentos, podían ser considerados como replicas biológicas. Observamos que no hubo diferencias significativas en la expresión de IFN-γ entre vacunados de los Exp. 7 y 8 (Fig. 3-11A), por lo cual agrupamos los animales de ambos experimentos por condición (vacunados o naïve) y observamos que las diferencias de expresión asociadas a la vacunación se fueron significativas (Fig. 3-11B).

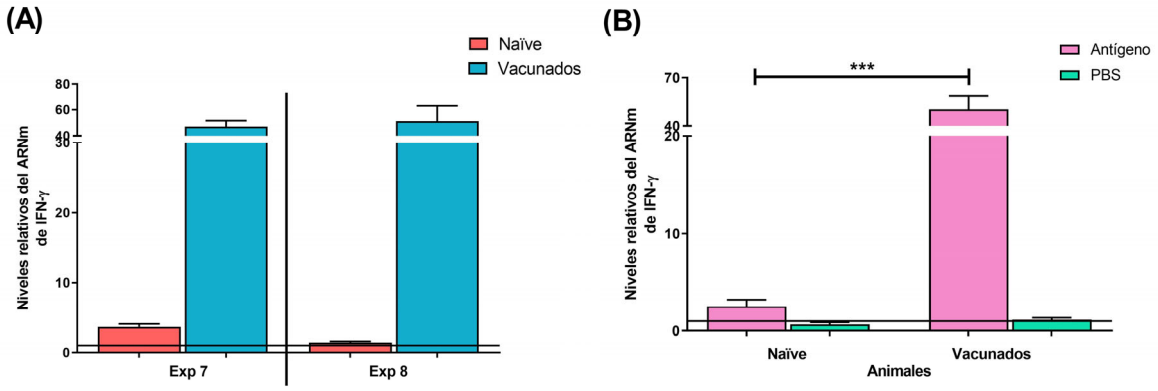

Figura 3-11. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en bovinos vacunados y naïve de los Exp. 7 y 8. Los incrementos fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígeno de FMVD. Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras sin estimular (PBS). En (A) se representa la Media ± SEM de los niveles relativos de los animales naïve (barra naranja) y vacunados (barra celeste) de ambos experimentos, en respuesta al antígeno de FMVD. Se aplicó el Test Mann-Whitney los animales vacunados de ambos experimentos. En (B) se muestra la Media ± SEM del nivel relativo en respuesta al antígeno de FMVD (barras rosadas) o PBS (barras verdes) del grupo de bovinos vacunados (n=21) y naïve (n=4). Se aplicó el Test Mann-Whitney para comparar respuesta específica contra el antígeno (***: $p< 0.001$). En ambos gráficos, la línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS).

En suma, estos resultados nos permitieron trabajar con los animales de los Exp 7 y 8 como si fueran un único grupo, por lo que seleccionamos los bovinos de ambos experimentos en función de: 1) los animales vacunados tengan niveles de expresión del ARNm de IFN-γ similares sí; 2) calidad del ARN adecuada para microarray; y 3) cantidad total de ARN (μg totales) suficiente para realizar los microarray. En la Tabla 3-1 se muestran los bovinos seleccionados para ser analizados por microarray junto a valor de RIN (del inglés: RNA Integrity Number). El nivel de expresión de IFN-γ de los bovinos vacunados seleccionados fue significativamente mayor que el inducido por los 4 naïve seleccionados (Fig. 3-12).

Experimento	Muestra		RIN	Niveles relativos del ARNm de IFN-γ
7	Naïve	7/N1	7,2	3,26
		7/N2	8,5	4,08
	Vacunados	7/V4	7,8	59,52
		7/V6	7,6	26,39
8	Naïve	8/N1	7,6	1,27
		8/N2	7,9	1,59
	Vacunados	8/V1	7,2	80,95
		8/V2	7,2	84,29

Tabla 3-1. Muestras seleccionadas para ser analizadas en el Microarray Vacunados *vs* Naïve

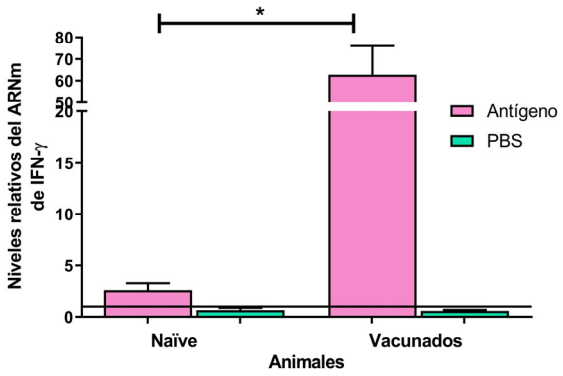

Figura 3-12. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ de animales vacunados y naïve seleccionados para el Microarray Vacunados *vs* Naïve. Los resultados se muestran como la Media ± SEM de los niveles relativos en sangre de los 4 vacunados y 4 naïve elegidos en respuesta al antígeno de FMVD (barras rosadas) o PBS (barras verdes). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras sin estimular (PBS). En ambos gráficos, la línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS). Se aplicó el Test Mann-Whitney para comparar respuesta específica contra el antígeno, ***: $p< 0.001$.

3.1.3.1.2 │ Análisis de la respuesta transcripcional

La comparación de la expresión en células de sangre periférica estimuladas con antígeno de FMDV de bovinos vacunados frente a la de animales naïve mostró que 486 sondas fueron expresadas significativamente diferente (Tabla 3-2), de las cuales 140 presentaron una intensidad significativamente mayor y 346 una significativamente menor en el grupo vacunados respecto al grupo naïve.

Comparación	Sondas (p < 0.01)		
Vacunados vs Naïve	486	140↑	346↓

Tabla 3-2. Recuento de sondas con intensidades significativamente diferentes en la comparación de *Vacunados vs Naïve*. ↑: Indica una intensidad significativamente mayor en el grupo vacunados respecto al grupo naïve. ↓: Indica una intensidad significativamente menor en el grupo vacunados respecto al grupo naïve

El curado de la lista de sondas diferencialmente expresada en esta comparación nos permitió anotar sonda a sonda 369 genes. Sin embargo, el análisis por GO arrojó que, de las 486 sondas, solo 350 mapearon individualmente con un único ID, 49 mapearon con dos o más ID y 45 no mapearon con ningún ID. A partir de la lista curada con 369 sondas, que se detalla en el Anexo 3, se definieron los DEGs en respuesta a la vacunación. Para definir los DEGs se consideraron genes: sobre-expresados a aquellos con un logQ mayor a 1 (correspondiente a un fold change de 2), y reprimidos aquellos con un logQ menor a -0,5 (correspondiente a un fold change de 0,7), observándose que la vacunación induce la sobre-expresión de 21% de los genes y la represión del 71%.

A partir de la diferencia en los niveles de expresión de cada gen fue realizado un heatmap y un análisis de cluster, comprobándose que los animales se agrupaban en vacunados y naïve (Fig.3-13). En ambos grupos de animales se identificaron clusters de genes con patrones similares de expresión. Esta agrupación nos dio la certeza sobre la calidad y robustés de los ensayos, pues a pesar que fueron realizados en diferentes días (viajes distintos a Argentina) y con bovinos provenientes de dos ensayos distintos, el reagrupamiento es bueno y se observa poca variabilidad entre individuos. En suma, esto reafirma que los animales de ambos experimentos pudieron ser considerados como réplicas biológicas debido a su comportamiento similar.

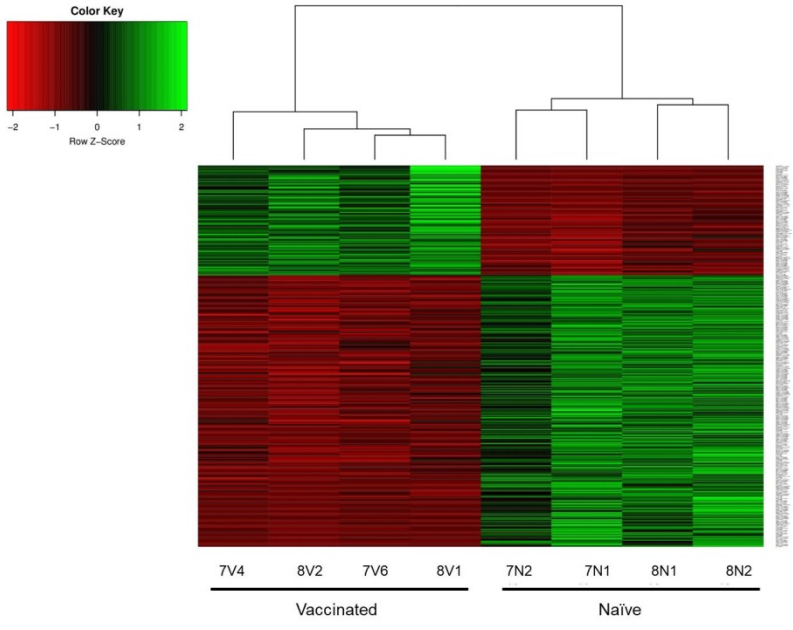

Figura 3-13. Heatmap de los niveles de expresión de células de sangre periférica de bovinos vacunados y de bovinos naïve, estimuladas con antígeno de FMVD. En rojo surgen los genes con altos niveles de expresión, en verde con bajos niveles y en negro con niveles intermedios. El Clustering se realizó en función de los niveles de expresión por grupo.

El test de enriquecimiento mostró que diferentes procesos están modificados significativamente en los animales vacunados respecto a los naïve. Los procesos biológicos que surgieron como modificados están asociados principalmente con la respuesta inflamatoria y señalización vía citoquinas. Las funciones moleculares con genes diferencialmente expresados fueron relacionadas con la señalización vía citoquinas, y en cuanto a los componentes celulares surgieron GO vinculados con los lisosomas y las vesículas fagocíticas (Tabla A7 y Fig. A9, Anexo 4). Dentro de los procesos biológicos destacamos el surgimiento del término GO "*regulación positiva de la producción de IFN-γ*", su modificación en respuesta a la vacunación fue importante dado que nos brindó evidencia de que todo el proceso fue correcto. En la estrategia experimental aplicada en estos ensayos utilicé la expresión de IFN-γ tanto como marcador de vacunación y protección contra FMDV para seleccionar los animales, como control del proceso. Por tanto, era esperable que la expresión de esta citoquina surgiera como regulada en forma positiva en este microarray.

El análisis de las vías metabólicas modificadas (REACTOME) mostró que la vacunación contra FMDV induce una alteración de 41 vías. En la Tabla A8 (Anexo 4) se detallan las vías modificadas conjuntamente con el valor de *p* asociado a la sobre-representación de genes diferencialmente expresados presentes en dichas vías. El REACTOME además arroja las reacciones modificadas en esa vía, las cuales son consideradas como "*pasos*" de la vía. El REACTOME define una "reacción" como cualquier evento en biología que cambia el estado de una molécula biológica. El número de reacciones modificadas, por al menos una molécula, en las vías sobreexpresadas sobre el número total de reacciones dentro de esa vía son detalladas en la Tabla A8 (Anexo 4). Para visualizar las vías metabólicas sobre-representadas, se generó un esquema categorizado respecto al valor *p* de todas las vías (*Reacfoam*) (Fig. A10, Anexo 4), observándose que las vías sobre-representadas en respuesta a la vacunación están relacionadas principalmente con el sistema inmune.

3.1.3.2 │ Comparación Vacunados Protegidos *vs* Vacunados No-Protegidos

3.1.3.2.1 │ Selección de los bovinos

Al diseñar el trabajo experimental nos habíamos propuesto analizar la respuesta transcripcional post-desafío, sin embargo como se mencionó en la Sección 3.1.1.3, no fue posible sangrar los animales luego del desafío debido a prohibiciones establecidas por el SENASA. Entonces, como alternativa para analizar la respuesta transcripcional todos los bovinos fueron sangrados previo al desafío. Posteriormente, con los resultados del nivel de protección separamos los animales vacunados en dos grupos: protegidos y no protegidos por la vacuna, y seleccionamos que animales serían analizados por micrarray.

Los bovinos considerados para microarray fueron los del Exp. 8, y la selección fue realizada de forma de tener animales que desarrollaron síntomas y aquellos que no. La reglamentación sobre las pruebas de eficacia establece que un animal queda protegido al desafío si no tiene síntomas en las extremidades. Las lesiones en la lengua no son consideradas al momento de definir la protección, debido a que es el sitio de inoculación. Sin embargo, nuestra estrategia consistió en elegir animales en función de la presencia o ausencia completa de síntomas (Tabla 3-3).

Animal	Observación de lesiones					Condición
	Lesiones Primarias	Lesiones Secundarias				
	Lengua	DD	DI	TD	TI	
V1	-	-	-	-	-	Protegido
V2	-	-	-	-	-	Protegido
V3	+	-	-	-	-	Protegido
V4	-	-	-	-	-	Protegido
V5	-	-	-	-	-	Protegido
V6	-	-	-	-	-	Protegido
V7	+	+	+	+	+	No Protegido
V8	+	+	-	+	+	No Protegido
V9	+	+	+	+	+	No Protegido
V10	-	-	-	-	-	Protegido
V11	-	-	-	-	-	Protegido
V12	+	+	-	-	-	No Protegido
V13	+	+	-	+	+	No Protegido
V14	+	-	-	-	-	Protegido
V15	+	-	-	-	-	Protegido
V16	+	-	-	-	-	Protegido
CNV 1	+	+	+	+	+	No Protegido
CNV 2	+	+	+	+	+	No Protegido

Tabla 3-3. Resultados clínicos post-desafío con FMDV-O1 Campos de bovinos del Exp.8. Todos los animales fueron evaluados durante los 7 días posteriores al desafío y fueron registradas la presencia y ubicación de las lesiones para cada animal. L: lengua, DD: extremidad delantera derecha, DI: extremidad izquierda derecha, TD: extremidad trasera derecha, TI: extremidad trasera izquierda, V: bovino vacunado, CNV: bovino control no vacunado.

Al igual que en el análisis anterior, para la selección también se tuvo en cuenta: 1) que los animales de una misma condición tengan niveles similares de expresión de IFN-γ; 2) calidad adecuada de las muestras de ARN; y 3) la cantidad necesaria (μg totales) para realizar los microarray.

En la Tabla 3-4 se enumeran los 8 animales utilizados para comparar los perfiles transcripcionales. Todos los ARN presentaron una calidad adecuada para realizar los microarray. La expresión del IFN-γ fue analizada en los animales seleccionados, y mostró que los 4 protegidos expresan significativamente mayores niveles del ARNm de IFN-γ que los 4 no protegidos (Fig. 3-14). En particular, los bovinos 8/V1 y 8/V2 (grupo Protegidos) habían sido previamente seleccionados para comparar la respuesta transcripcional de vacunados *vs* naïve.

Condición	Muestra	RIN	Niveles relativos del ARNm de IFN-γ
Protegidos	8/V1	7,2	80,95
	8/V2	7,2	84,29
	8/V4	7,2	156,97
	8/V11	7,2	126,18
No-Protegidos	8/V7	6,4	8,46
	8/V8	6,6	10,69
	8/V9	6,8	18,04
	8/V13	7,6	15,22

Tabla 3-4. Muestras seleccionadas para ser incluidas en el Microarray Protegidos *vs* No-Protegidos

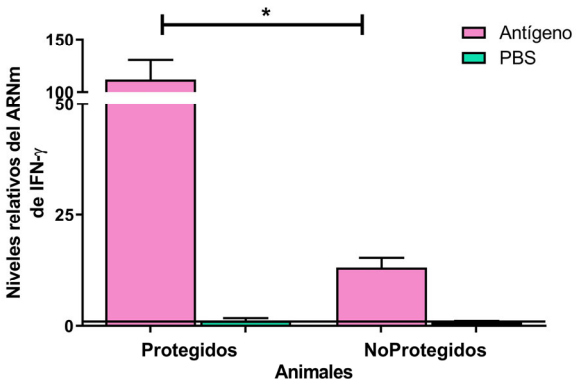

Figura 3-14. Nivel relativo del ARNm de IFN-γ de los animales vacunados protegidos y no protegidos al desafío con FMVD seleccionados para ser incluidos en el Microarray *Protegidos vs No Protegidos*. Los resultados muestran la Media ± SEM de los niveles relativos en sangre de los 4 protegidos y 4 no protegidos en respuesta al antígeno de FMVD (barras rosadas) o PBS (barras verdes). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras sin estimular (PBS). La línea trazada (n=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ del grupo naïve sin estimular (PBS). Se aplicó el Test Mann-Whitney para comparar respuesta contra el antígeno en animales vacunados protegidos y no protegidos, *: $p< 0.01$.

3.1.3.2.2 │ Análisis de la respuesta transcripcional

La comparación de la expresión génica entre las células de sangre de bovinos vacunados protegidos frente a las de animales vacunados no protegidos mostró que 341 sondas fueron modificadas significativamente en respuesta al estímulo con antígeno de FMVD (Tabla 3-5). Un total de 246 sondas presentaron una intensidad significativamente mayor y 65 una intensidad significativamente menor en el grupo protegidos en relación al grupo no protegido. El curado de la lista de sondas modificadas nos permitió anotar 291 genes, y la base de datos GO nos arrojó que 285 mapearon cada una con un único ID, 22 mapearon con dos ID y 32 no mapearon con ningún ID. La lista curada de sondas diferencialmente expresadas se detalla en el Anexo 3. Los DEGs en respuesta a la vacunación efectiva fueron definidos con las mismas pautas que las aplicadas en el microarray Vacunados *vs* Naïve. Nuestros resultados mostraron que la vacunación efectiva asociada a la protección indujo la expresión del 77% y la represión del 16% del total de los genes diferencialmente expresados.

Comparación	Sondas (p < 0.01)		
Protegidos vs NoProtegidos	341	276↑	65↓

Tabla 3-5 Recuento de sondas con intensidades significativamente diferentes en la comparación de *Protegidos vs No-Protegidos*. ↑: Indica una intensidad significativamente mayor en el grupo protegido respecto al grupo no protegido. ↓: Indica una intensidad significativamente menor en el grupo protegido respecto al grupo no protegido.

A partir del análisis de cluster con los niveles de expresión de cada gen en cada animal fue posible comprobar que los animales se agruparon en protegidos y no protegidos (Fig. 3-15). Al igual que lo observado en la comparación Vacunados *vs* Naïve, esta agrupación nos brindó primero la certeza de que los animales fueron seleccionados correctamente en función de los síntomas, segundo que el marcador IFN-γ se comportaba como tal en la comparación, y además y lo más importante, que nuestra hipótesis de trabajo estaba funcionando ya que seguramente pudiéramos obtener varios marcadores de protección luego de la validación, además de los ya encontrados marcadores de vacunación.

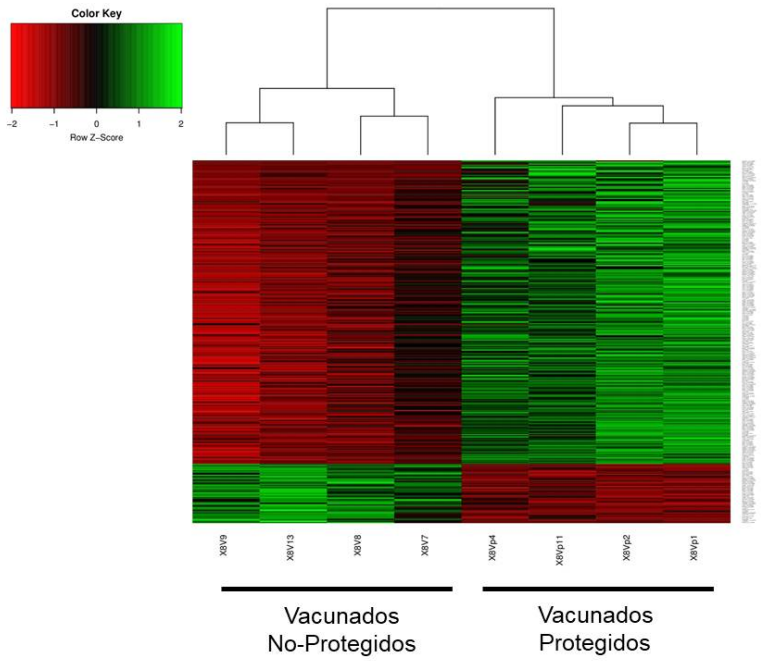

Figura 3-15. Heatmap de los niveles de expresión de células de sangre periférica de bovinos vacunados protegidos y vacunados no protegidos, estimuladas con antígeno de FMVD. En rojo surgen los genes con altos niveles de expresión, en verde con bajos niveles y en negro con niveles intermedios. El Clustering se realizó en función de los niveles de expresión por grupo.

Es importante destacar que, el dentro de los DEGs sobre-expresados en los animales protegidos surgió el IFN-γ, como era de esperar, pues fue establecido como marcador en las pruebas previas a los experimentos de microarrays.

En el test de enriquecimiento surgió un número limitado de GO si comparamos con los resultados de Vacunados *vs* Naïve. Los términos GO biológicamente funcionales que se encuentran sobre-representados están principalmente asociados a la traducción (Tabla A9, Anexo 4). Por otra parte, la vacunación efectiva contra FMDV fue capaz de inducir la sobre-

representación de 76 vías metabólicas (REACTOME), las cuales son detalladas en la Tabla A10 (Anexo 4). Una gran proporción de las vías modificadas se encuentran vinculadas con metabolismo del ARN y del ciclo celular, sin embargo, se destacan vías modificadas dentro del sistema inmune como por ejemplo la vía "*Regulation of IFNG signaling*" con un valor *p* de 0.008 y dos de cuatro reacciones modificadas dentro de la vía. En el esquema categorizado (*Reacfoam)* de la figura A12 (Anexo 4) fueron representadas las vías sobre-representadas en respuesta a la vacunación efectiva contra FMDV.

En suma, en esta etapa del trabajo destacamos que, si bien la estrategia experimental hacía prever una gran variabilidad por tratarse de animales de campo y agrupados de ensayos diferentes, logramos resultados consistentes al analizar la respuesta transcripcional global frente a la vacunación en sangre estimulada con antígeno de FMDV, mediante microarray. La elección de los animales para ser analizados por microarray en ambas comparaciones tuvo un trabajo previo importante en el cual se midieron los niveles de ARNm de varias citoquinas entre las cuales habían muchas que no tuvieron variación entre los experimentos, sin embargo pudimos preestablecer un biomarcador de vacunación y de protección como lo fue el ARNm de IFN-γ. Estos resultados con citoquinas que se movían entre una condición experimental y otra y otras que no lo hacían, nos validó el sistema, desde el antígeno utilizado hasta la estrategia de trabajo utilizada, y permitió ir hacia el estudio por microarrays con experimentos en cierta forma "validados". Por lo cual era esperable que la expresión de IFN-γ surgiera inducida en ambas comparaciones, pero sólo se vio inducido en la comparación entre vacunados protegidos *vs* no protegidos. En la comparación entre vacunados *vs* naïve no surgió como inducida su expresión, pero en los vacunados se sobre-expresaron genes asociados a la regulación positiva de la producción de IFN-γ, respecto a los bovinos naïve. Además, observamos que la respuesta de los bovinos a la vacunación está asociada principalmente con la inducción de genes de respuesta inflamatoria y señalización vía citoquinas. Cuando comparamos la respuesta, previo al desafío, de animales vacunados que resultaron protegidos y no-protegidos, observamos que se vieron modificados un número limitado de procesos. Las vías modificadas asociadas a la respuesta protectiva están vinculadas con metabolismo del ARN, la traducción y el ciclo celular.

3.1.3.3 │ Definición de "*Firma Molecular*" en la vacunación contra FMDV

Para definir la "*firma molecular*" se seleccionaron genes candidatos como marcadores de la vacunación (comparación Vacunados *vs* Naïve) así como marcadores de respuesta protectiva (comparación vacunados Protegidos *vs* vacunados No Protegidos). La selección de los posibles candidatos fue realizada considerando: que fueran DEGs, que surgieran en una u otra comparación o en ambos ensayos, y su relevancia inmunológica En el microarray de vacunados Protegidos *vs* No Protegidos surgieron un menor número de funciones biológicas o

vías metabólicas alteradas que en la comparación Vacunados *vs* Naïve. La selección de posibles marcadores asociada a la protección fue realizada en observando nivel de expresión, así como fold increase o logQ y/o *p*-value del resultado de la comparación entre las diferentes condiciones experimentales.

A partir de la lista curada de genes, fueron seleccionados 63 genes candidatos para validar la parte técnica y la expresión de estos genes como marcadores. Para ello, fueron utilizados los ARN incluidos en los dos ensayos de microarray, los cuales fueron retrotranscriptos con la enzima SuperScript III, asegurándonos una mejor calidad del ADNc. Las qPCR fueron realizadas con sondas Taqman o Sybr Green, para ciertos genes fueron adquiridas sondas Taqman y primers prediseñados ("inventoried assay") en Applied Biosystems, mientras que para los restantes genes fueron diseñados primers *a novo* (Sección 2.4.3, M&M). La lista de genes que fueron analizados y el tipo de sistema utilizado para cuantificar, se detalla en el Anexo 1. La puesta a punto se realizó con pooles de ADNc de control. Para la cuantificación fue empleado el gen β2M como gen normalizador y relativizado contra la condición control (promedio de los niveles absolutos de los bovinos naïve estimulados con el antígeno de FMDV). Además, fueron incluidos otros genes de expresión constitutiva como ARN ribosomal 18S y beta actina (*actb*) como controles internos. Las qPCRs para genes *thsd4, rpl9, gpr128* y *pigr*, para los cuales se había diseñados los primers, no fue posible optimizarlas. El análisis estadístico fue realizado con el test de Mann-Whitney, donde comparamos la expresión de los genes por qPCR entre los vacunados y naïve, y entre los protegidos y no protegidos. La diferencia en la expresión de un gen está validada técnicamente si su perfil es similar entre ambas técnicas (microarray y qPCR).

En suma, de los 59 candidatos a evaluar se validaron 32 genes (Tabla 3-6), de los cuales 26 son marcadores de la vacunación, 9 son marcadores de la respuesta protectiva, y 3 son marcadores compartidos dado que estaban presentes en ambas comparaciones.

Microarray	Genes evaluados	Genes validados
Vacunados vs Naïve	33	23
Protegidos vs No-Protegidos	17	6
Ambos	9	3

Tabla 3-6. Número de genes elegidos en los ensayos de microarray

Los resultados de la validación de los genes marcadores de vacunación y de la respuesta protectiva son mostrados en la figura 3-16A y 3-16B, respectivamente. En dichos gráficos puede observarse que los perfiles de expresión obtenidos por microarray y por qPCR fueron similares.

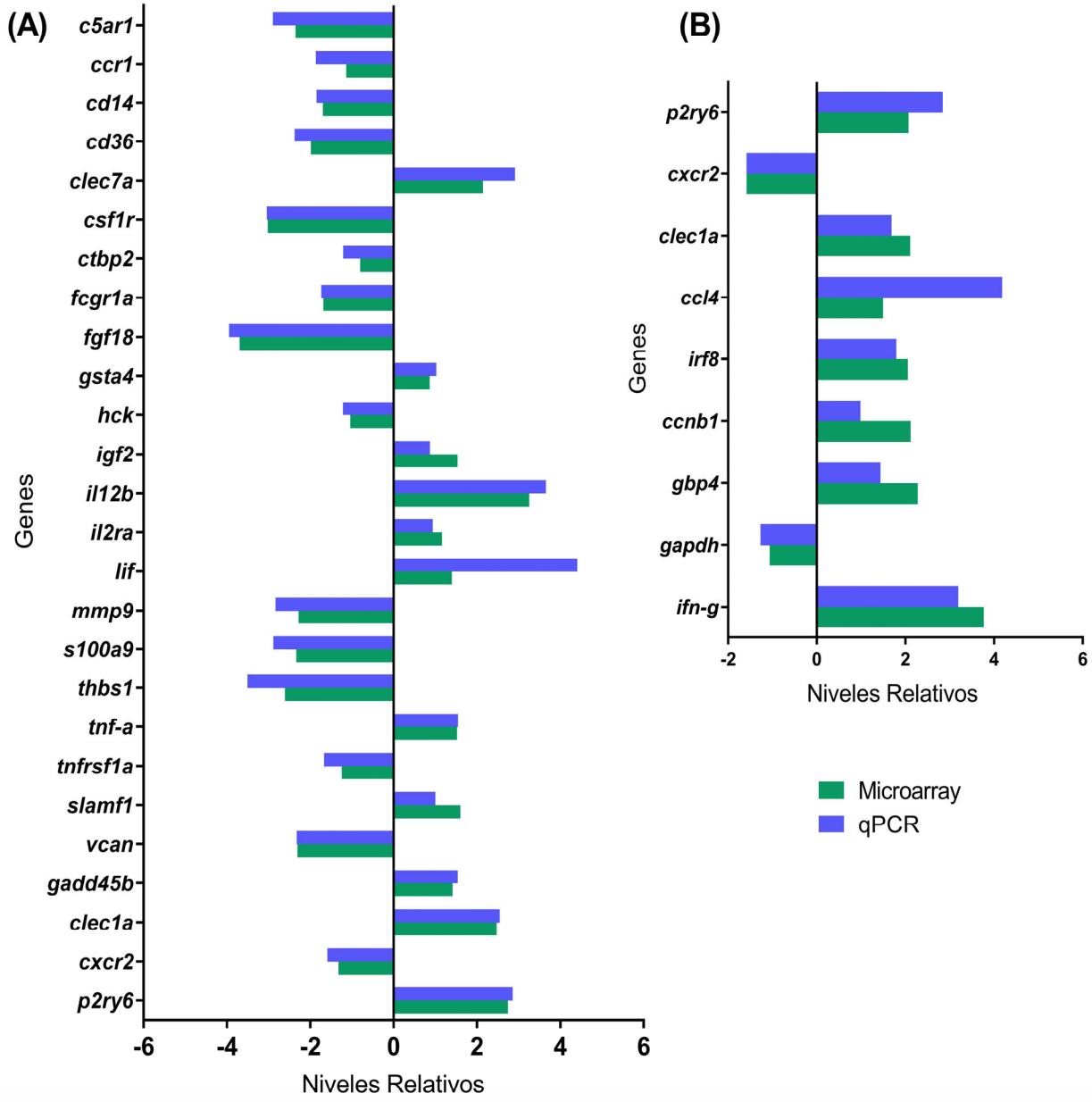

Figura 3-16. Comparación de los patrones de expresión génica, por Microarray y RT-qPCR. En (A) se muestran los genes seleccionados del microarray Vacunados *vs* Naïve, y en (B) genes seleccionados del microarray Protegidos *vs* No Protegidos. Los niveles de los ARNm por qPCR (barra azul) fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como niveles relativos al promedio de las muestras del grupo naïve sin estimular (PBS). Las barras verdes corresponden a los valores de LogQ surgido del análisis de microarray.

El análisis de los 3 genes compartidos, por microarray y qPCR, mostró que tienen un perfil la expresión similar cuando comparamos vacunados *vs* naïve y protegidos *vs* no protegidos, *p2ry6* y *clec1a* se estimulan mientras que *cxcr2* se reprime, constituyendo así marcadores de vacunación y de la respuesta protectiva (Fig. 3-17).

Cuatro genes (*ifn-γ, tnf-α*, *il-12B* y cxcr5) fueron analizados por ambos sistemas de manera de comparar ambos sistemas de cuantificación (sondas Taqman y Sybr Green). El nivel de expresión de estos genes fue similar entre ambos sistemas de cuantificación. La expresión del gen *cxcr5* no fue validada por qPCR, ni con Taqman ni Sybr Green, mientras que la de los otros

tres genes si fue validada, ya que tuvieron resultados muy similares a los observados por microarrays.

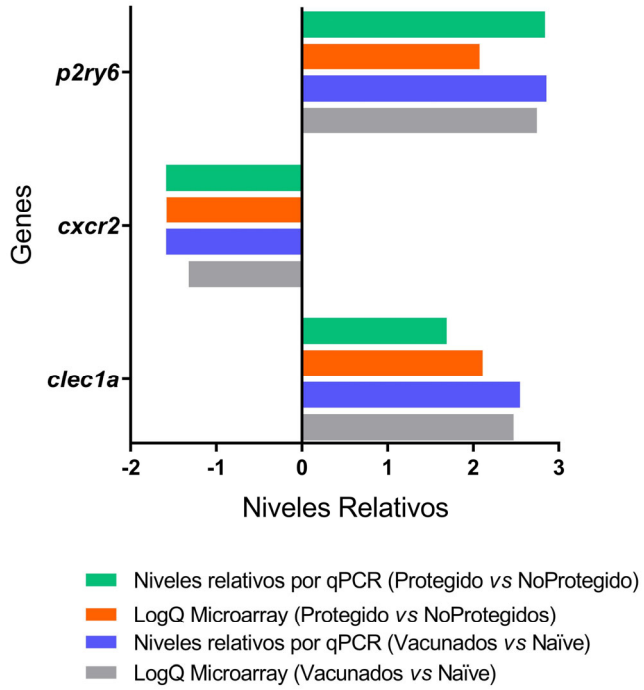

Figura 3-17. Comparación de los patrones de expresión génica, por Microarray y RT-qPCR, de los genes compartidos y validados entre los dos microarray. Los niveles de los ARNm por qPCR (barra azul y verde) fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como niveles relativos al comparar con el promedio de las muestras del grupo Naïve estimuladas con PBS. Las barras grises y naranjas corresponden a los valores de LogQ surgido del microarray.

En suma, a partir de los genes validados definimos una "*firma molecular*" de vacunación con los genes del microarray Vacunados *vs* Naïve y otra asociada a la respuesta protectiva con los genes de la comparación de Protegidos *vs* No Protegidos (Tabla 3-7). Asociados a estos marcadores están las funciones biológicas y vías metabólicas que surgieron como alteradas en respuesta a la vacunación contra FMDV en los test de enriquecimiento y en el REACTOME (Sección 3.1.3.1.2 y Tablas A7 y A8, Anexo 4). En las Tabla 3-8 se muestran los genes marcadores de vacunación y las funciones biológicas y vías metabólicas en las que están incluidos. Surgen como modificadas las vías o funciones biológicas asociadas: a la producción de citoquinas, en particular IFN-γ y TNF-α, a la señalización vía citoquinas, a la respuesta inflamatoria, a la quimiotaxis de neutrófilos y de células mononucleares, a la regulación de la proliferación celular, en particular de células T activadas. Estas funciones o vías alteradas adquieren relevancia particular en la respuesta contra FMDV asociada a la vacunación debido a que fue validado la estimulación o inhibición de uno o algunos de sus genes.

En particular, los genes *clec1a* y *vcan* no surgieron asociados a los términos GO ni a las vías metabólicas del REACTOME alteradas (con un valor $p < 0,05$) (Sección 3.1.3.1.2 y Tablas A7 y A8, Anexo 4). Clec1a aparece ligada a funciones biológicas (GO) asociadas con la señalización como receptor transmenbrana y a la respuesta de defensa, mientras que Vcan fue vinculada por homología con humanos con la vía metabólica "*Endogenous TLR signaling*" conjuntamente con otros genes también validados (*cd14*, *mmp9* y *s100a9*) (Tabla 3-8).

Microarray	Simbolo Gen	Nombre gen
Marcadores de vacunación contra FMDV	*c5ar1*	complement component 5a receptor 1
	ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1
	cd14	CD14 molecule
	cd36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
	clec7a	C-type lectin domain family 7, member A
	csf1r	colony stimulating factor 1 receptor
	ctbp2	C-terminal-binding protein 2
	fcgr1a	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
	fgf18	fibroblast growth factor 18
	gsta4	Glutathione S-transferase A4
	gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
	hck	Hemopoietic cell kinase
	igf2	insulin-like growth factor 2
	il12b	interleukin 12B (p40)
	il2ra	interleukin 2 receptor, alpha
	lif	leukemia inhibitory factor)
	mmp9	matrix metallopeptidase 9
	s100a9	S100 calcium binding protein A9
	slamf1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
	thbs1	thrombospondin 1
	tnf- α	tumor necrosis factor
	tnfrsf1a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
	vcan	vesican core protein
	clec1a	C-type lectin domain family 1, member A
	cxcr2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2
	p2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
Marcadores de la respuesta protectiva contra FMDV	*Ifn-* γ	interferon, gamma
	gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	gbp4	guanylate binding protein 4
	ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
	ccnb1	Cyclin B1
	irf8	interferon regulatory factor 8
	clec1a	C-type lectin domain family 1, member A
	cxcr2	chemokine (C-X-C motif) receptor 2
	p2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6

Tabla 3-7. "*Firma molecular*" aociada a la vacunación y de respuesta protectiva contra FMDV

De igual modo que para los marcadores de vacunación, en la Tabla 3-9 se detallan los genes marcadores de la respuesta protectiva contra FMDV y las funciones biológicas y vías metabólicas asociadas. La mayoría de los genes (todos seleccionados en función de su nivel de expresión) no pudieron ser asociados a las funciones biológicas y vías metabólicas alteradas en el microarray de Protegidos *vs* No Protegidos (Sección 3.1.3.2.2 y Tablas A9 y A10, Anexo 4). Sólo los genes *ifn-g*, *irf8* y *gapdh* pudieron ser asociados a vías metabólicas alteradas (Reactome Pathway, versión 69 del 26/06/2019), las cuales están vinculadas con la señalización y función del IFN-γ. Otras funciones biológicas que surgen asociadas a la "*firma molecular*" son la señalización y función de citoquinas, y control del ciclo celular y del proceso de transcripción.

Simbolo Gen	Termino GO / Reactome		
csf1r ↓	BP	GO:0001819	positive regulation of cytokine production
gadd45b ↑ *p2ry6* ↑	BP	GO:0001934	positive regulation of protein phosphorylation
fcgr1a ↓ *tnf-α* ↑	BP	GO:0002675	positive regulation of acute inflammatory response
il12b ↑ *fcgr1a* ↓ *tnf-α* ↑	BP	GO:0002863	positive regulation of inflammatory response to antigenic stimulus
clec1a ↑	BP①	GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity
gsta4 ↑	BP①	GO:0006749	glutathione metabolic process
clec1a ↑	BP①	GO:0006952	defense response
il2ra ↑	BP	GO:0006954	inflammatory response
clec1a ↑	BP①	GO:0007166	cell surface receptor signaling pathway
c5ar1 ↓	BP	GO:0010243	response to organonitrogen compound
ctbp2 ↓	BP	GO:0016192	vesicle-mediated transport
fgf18 ↓	BP	GO:0030334	regulation of cell migration
c5ar1 ↓ *cxcr2* ↓ *s100a9*	BP	GO:0030593	neutrophil chemotaxis
cd14 ↓ *clec7a* ↑ *il12b* ↑ *slamf1* ↑ *tnf-α* ↑	BP	GO:0032729	positive regulation of interferon-gamma production
cd14 ↓ *clec7a* ↑ *il12b* ↑ *thbs1* ↓ *tnf-α* ↑	BP	GO:0032760	positive regulation of tumor necrosis factor production
igf2 ↑ *il12b* ↑ *slamf1* ↑	BP	GO:0042104	positive regulation of activated T cell proliferation
c5ar1 ↓ *clec7a* ↑ *csf1r* ↓ *fcgr1a* ↓ *fgf18* ↓ *hck* ↓ *igf2* ↑ il12b↑ *lif* ↑ *mmp9* ↓ *p2ry6* ↑ *slamf1* ↑ *thbs1* ↓ *tnf-α* ↑	BP	GO:0042127	regulation of cell population proliferation
thbs1 ↓	BP	GO:0043281	regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process
gadd45b ↑	BP	GO:0043406	positive regulation of MAP kinase activity
lif ↑	BP	GO:0045785	positive regulation of cell adhesion
thbs1 ↓	BP	GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation
clec7a ↑ *s100a9* ↓ *tnfrsf1a* ↓	BP	GO:0050727	regulation of inflammatory response
cd36 ↓	BP	GO:0055094	response to lipoprotein particle
cd36 ↓	BP	GO:0071402	cellular response to lipoprotein particle stimulus
c5ar1 ↓ *ccr1* ↓ *slamf1* ↑	BP	GO:0071675	regulation of mononuclear cell migration
p2ry6 ↑	BP	GO:1904707	positive regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation
mmp9 ↓	BP	GO:2001268	negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway
ccr1 ↓ *csf1r* ↓ *cxcr2* ↓ *il12b* ↑ *il2ra* ↑ *tnfrsf1a* ↓	MF	GO:0019955	cytokine binding
ccr1 ↓ *cxcr2* ↓ *il12b* ↑ *il2ra* ↑	MF	GO:0004896	cytokine receptor activity
cd14 ↓ *cd36* ↓ *tnf-α* ↑ *tnfrsf1a* ↓	CC	GO:0045121	membrane raft
cd14 ↓	RT	R-BTA-166016.1	Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade
cd14 ↓	RT	R-BTA-166271.1	IRF3/IRF7 recruitment to p-TBK1/p-IKK epsilon bound to the activated TLR4
cd36 ↓	RT	R-BTA-168256.1	Immune System
ccr1 ↓ *cd36* ↓ *csf1r* ↓ *cxcr2* ↓ *fcgr1a* ↓ *hck* ↓ *il12b* ↑ *il2ra* ↑ *lif* ↑ *mmp9* ↓ *tnf-α* ↑ *tnfrsf1a* ↓	RT	R-BTA-449147.1	Signaling by Interleukins
il12b ↑	RT	R-BTA-6783783.1	Interleukin-10 signaling
cd36 ↓ *il12b* ↑	RT	R-BTA-6785807.1	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling
cd36 ↓ *cxcr2* ↓	RT	R-BTA-6798695.1	Neutrophil degranulation
c5ar1 ↓	RT②	R-HSA-8852809	Regulation of Complement cascade/CPN, CPB2 cleave C3a, C5a
cd14 ↓	RT②	R-HSA-937041.1	IKK complex recruitment mediated by RIP1
c5ar1 ↓	RT	R-BTA-168249.1	Innate Immune System
cd14 ↓ *mmp9* ↓ *s100a9* ↓ *vcan* ↓	PID③		Endogenous TLR signaling (HUMANO)

Tabla 3-8. Genes candidatos para la "*firma molecular*" de vacunación y su relación con la funciones biológicas y vías metabólicas alteradas en el microarray Vacunado *vs* Naïve. Análisis realizado con las bases de datos de la ontología GO (publicada el 2018-07-03) y de Reactome Pathway (versión 69 del 26/06/2019).
↑: gen con expresión estimulada en respuesta a la vacunación contra FMDV
↓: gen con expresión inhibida en respuesta a la vacunación contra FMDV
BP: proceso biológico
MF: función molecular
CC: componente celular
RT: Reactome
①: Función biológica no surgida en el test de enriquecimiento (GO)
②: Vías metabólicas para *Homo sapiens* (REACTOME)
③: Vía metabólica descrita en PID (del inglés Pathway Interaction Database) (http://www.ndexbio.org/#/)

Simbolo Gen	Termino GO/Reactome		
clec1a ↑	BP	GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity
	BP	GO:0006952	defense response
	BP	GO:0007166	cell surface receptor signaling pathway
cxcr2 ↓	BP	GO:0030593	neutrophil chemotaxis
	MF	GO:0004896	cytokine receptor activity
	MF	GO:0019955	cytokine binding
	RT	R-BTA-449147.1	Signaling by Interleukins
	RT	R-BTA-6798695.1	Neutrophil degranulation
Ifn-γ ↑	BP	GO:0050715	positive regulation of cytokine secretion
	BP	GO:0050729	positive regulation of inflammatory response
	BP	GO:0051607	defense response to virus
	RT	R-BTA-1169410	Antiviral mechanism by IFN-stimulated genes
irf8 ↑	BP	GO:0032729	positive regulation of interferon-gamma production
	BP	GO:0032735	positive regulation of interleukin-12 production
	BP	GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II
	MF	GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific
Ifn-γ ↑ irf8 ↑	BP	GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway
	RT①	R-BTA-877300.1	Interferon gamma signaling
	RT①	R-BTA-877312.1	Regulation of IFNG signaling
Ifn-γ ↑ gapdh ↓	RT①	R-BTA-156827.1	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression
gbp4 ↑ irf8 ↑	BP	GO:0071346	cellular response to interferon-gamma
p2ry6 ↑	BP	GO:0001934	positive regulation of protein phosphorylation
	BP	GO:1904707	positive regulation of vascular associated smooth muscle cell proliferation
	BP	GO:0042127	regulation of cell population proliferation
ccl4 ↑	RT	R-BTA-162582	Signaling Pathways
	RT	R-BTA-372790	Signaling by GPCR
	RT	R-BTA-388396	GPCR downstream signalling
	RT	R-BTA-418594	G alpha (i) signalling events
ccnb1 ↑	RT	R-BTA-69278	Cell Cycle, Mitotic
	RT	R-BTA-69620	Cell Cycle Checkpoints
	RT	R-BTA-74160	Gene expression (Transcription)
gbp4 ↑	RT	R-HSA-1031716.3	Expression of IFNG-stimulated genes

Tabla 3-9. Genes candidatos para la "*firma molecular*" de respuesta protectiva y la funciones biológicas y vías metabólicas asociadas.
↑: gen con expresión estimulada en respuesta a la vacunación contra FMDV
↓: gen con expresión inhibida en respuesta a la vacunación contra FMDV
BP: proceso biológico
MF: función molecular
RT: Reactome
①: Vías metabólicas surgidas en el análisis Reactome Pathway (versión 69 del 26/06/2019)

Posteriormente, fue analizado el perfil de expresión de los genes validados técnicamente con un número mayor de muestras para comenzar la validación como marcadores. Para ello, fueron agregados animales (ADNc de animales vacunados, y vacunados protegidos y no protegidos), y fue analizada la expresión de genes para los cuales contábamos con primers específicos. El perfil de expresión asociado a la vacunación, al incluir un mayor número de animales

(vacunados n=18 y naïve n=4), fue similar al observado durante la validación del microarray. Para el caso de los transcriptos correspondientes a los genes de *clec7a*, *lif* y *tnf-*α, el análisis por qPCR permitió validar técnicamente con las muestras analizadas en el microarray, sin embargo, en el análisis con 18 vacunados no fueron observadas diferencias estadísticas entre la respuesta de los vacunados respecto a los naïve (Fig. 3-18).

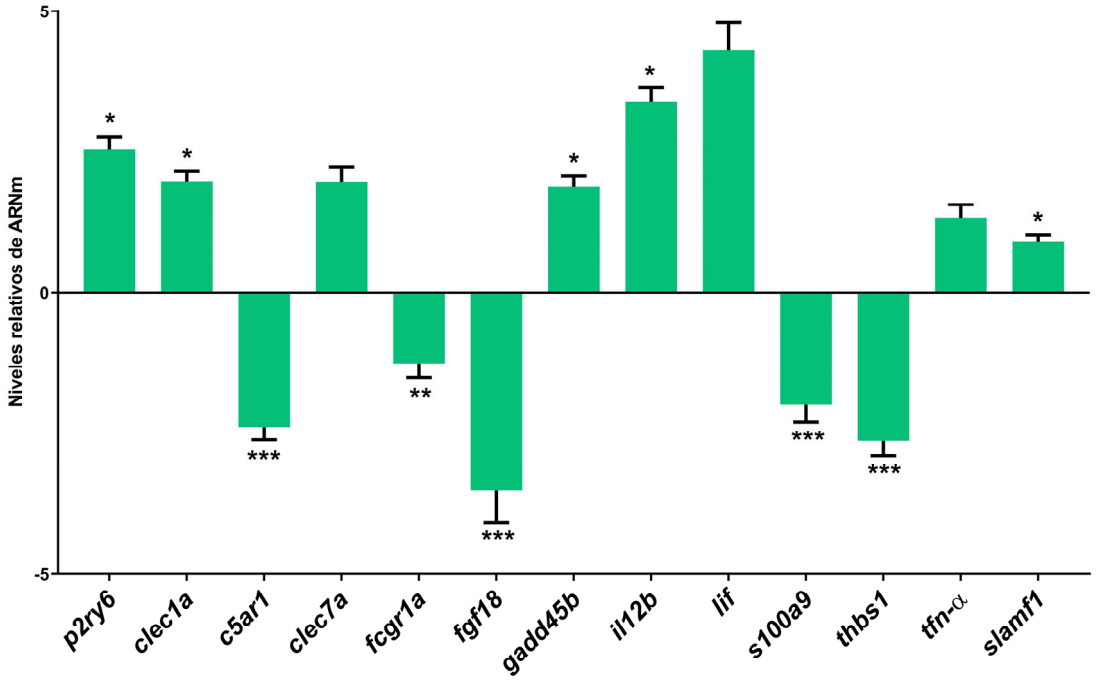

Figura 3-18. Niveles relativos de los ARNm de genes validados del Microarray *Vacunados vs Naïve* cuantificados por qPCR (Sybr Green). Los resultados se muestran, en escala logarítmica, como la Media ± SEM de los niveles relativos del grupo de 18 vacunados en respuesta al antígeno de FMVD. Para cada muestra, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras de animales naïve sin estimular (PBS). Se aplicó el Test Mann-Whitney para comparar respuesta específica de cada gen en animales vacunados respecto a los naïve, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.0001$.

La comparación de protegidos *vs* no protegidos permitió validar nueve genes, de los cuales 7 fueron reanalizados con un mayor número de muestras (protegidos n=7 y no protegidos n=5). Los resultados mostraron que el perfil de expresión génica asociado a la protección por la vacunación fue similar a lo observado durante la validación. Todos los genes mantuvieron las diferencias estadísticas al comparar las expresiones entre los bovinos protegidos y no protegidos (Fig. 3-19).

En resumen, los resultados nos permiten definir dos "*firmas moleculares*" una de vacunación y otra de respuesta protectiva contra FMDV, a partir de sangre estimulada con el antígeno de FMDV a los 30 dpv. Contamos con un set de 26 genes marcadores de la vacunación que nos permite diferenciar animales vacunados de los animales naïve. Asimismo, disponemos de un set de 9 genes marcadores de la vacunación efectiva contra FMDV que nos permite diferenciar los animales vacunados protegidos de los vacunados no protegidos frente al desafío con FMDV.

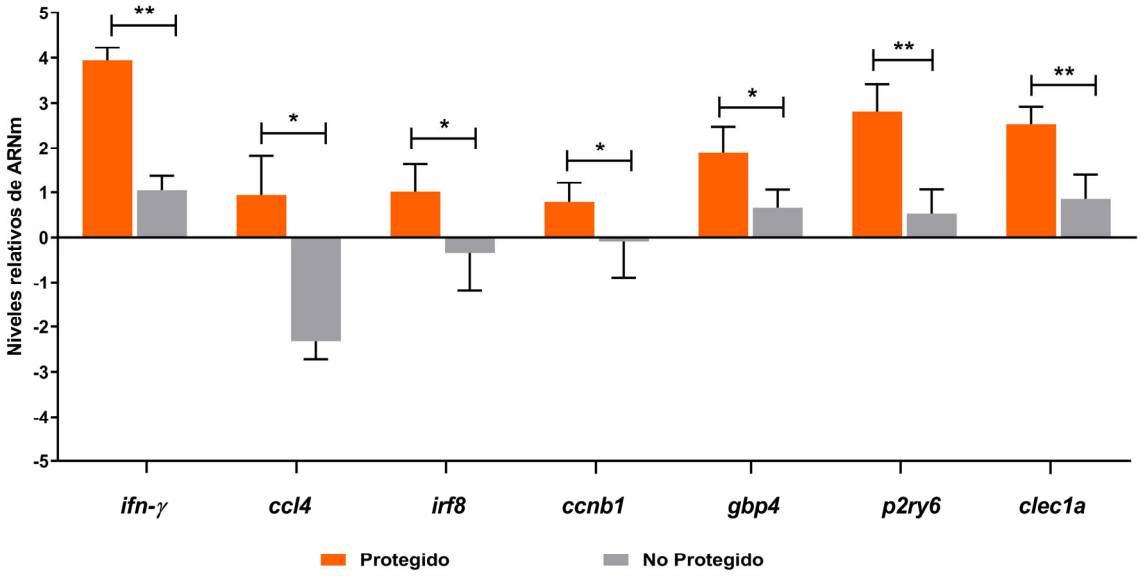

Figura 3-19. Niveles relativos de los ARNm de genes validados del Microarray *Protegidos vs No Protegidos* cuantificados por qPCR (Sybr Green). Los resultados se muestran, en escala logarítmica, como la Media ± SEM de los niveles relativos de un grupo de 7 vacunados protegidos y otro de 5 vacunados no protegidos, en respuesta al antígeno de FMV. Para cada muestra, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como niveles relativos al comparar con el promedio del grupo de naïve sin estimular (PBS). Se aplicó el Test Mann-Whitney para comparar respuesta específica de cada gen en animales vacunados protegidos respecto a los vacunados no protegidos, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

3.1.4 | DISCUSIÓN

La fiebre aftosa es una de las enfermedades más contagiosas del ganado y causa graves pérdidas económicas. La vacunación sistemática ha colaborado con la erradicación de la enfermedad en varias regiones o países reduciendo la incidencia de los brotes. Sin embargo, el interés sobre la enfermedad se mantiene latente debido a que aún se registran brotes recurrentes en diferentes partes del mundo, incluso en zonas libre de fiebre aftosa. La comprensión de los mecanismos subyacentes a la inmunidad protectiva en bovinos y ovinos es sensiblemente menor que la que se tiene en animales de laboratorio, que por otra parte, no siempre reproducen adecuadamente lo que sucede en las especies de destino. Resulta esencial avanzar en el conocimiento de las respuestas inmunes asociadas a la vacunación efectiva en animales destino.

La respuesta de anticuerpos neutralizantes y serotipo-específica contra FMDV en general considerada como el factor más importante para conferir protección (Brehm et al., 2008; Grubman and Baxt, 2004; McCullough et al., 1992; Robiolo et al., 1995), sin embargo hay claros indicios de que el panorama es más complejo dado que la inducción de una respuesta de anticuerpos específicos no siempre asegura la inmunidad ni la protección de los animales contra FMDV (McCullough et al., 1992). Además, se ha informado que animales, sin una respuesta humoral específica detectable, resultaron protegidos frente al desafío con FMDV (Sanz-Parra et al., 1999), llevando a reconsiderar el correlato de protección asociado a las vacunas contra FMDV. Este escenario ha llevado a sugerir la necesidad de incluir al correlato actual de anticuerpos otros parámetros inmunológicos, como ser marcadores de inmunidad de las células T o expresión de citoquinas, de forma de predecir una manera más precisa la protección inducida por la vacunación (Robinson et al., 2016). El conocimiento sobre el papel de la respuesta celular en la protección contra FMDV en bovinos aún es limitado. Sin embargo, se ha reportado que la vacunación induciría la respuesta de células T $CD4^+$ (Carr et al., 2013; Doel, 1996; Oh et al., 2012; Parida et al., 2006b), y T $CD8^+$ productoras de IFN-γ (Guzman et al., 2008), como así también un aumento de las células T$\gamma\delta$ con fenotipo similar a células NK capaces de lisar las células infectadas (Guerra-Maupome et al., 2019). Por otra parte, el análisis del perfil de producción de citoquinas en respuesta a antígenos del patógeno puede proporcionar información sobre los mecanismos de protección, patogénesis, interacción huésped-patógeno, mecanismos de evasión, como así también permite evaluar las respuestas inmunes asociadas la vacunación (Parida et al., 2006b; Plotkin, 2013; Robinson et al., 2016; Thakur et al., 2012).

El avance de las "*Omicas*", de la plataforma de la *Biología de Sistemas*, y el desarrollo consecuente de herramientas biotecnológicas para el análisis masivo de la información biológica generada (técnicas "*high-troughput*"), ha permitido visualizar de manera sistemática, cuantitativa y simultáneamente el comportamiento del sistema inmune y predecir su respuesta frente a una vacuna. Como resultado, ambas plataformas han brindado información valiosa para predecir la inmunogenicidad de vacunas identificando "*firmas moleculares*" de protección y proporcionando información sobre los mecanismos relevantes vinculados con la eficacia de una vacuna (Cotugno et al., 2019; Pezeshki et al., 2019; Sharma et al., 2019). En el contexto de este trabajo de tesis, nos planteamos utilizar una de las metodologías "*Omicas*" como es la transcriptómica para definir una firma molecular de eficacia contra FMDV. La identificación de biomarcadores de protección *in vitro* podría acelerar el desarrollo de vacunas nuevas o los procesos de mejora de vacunas existentes, y simplificaría el diseño de ensayos *in vivo* de eficacia de una vacuna. Así, nos enfocamos en analizar la respuesta transcripcional global de bovinos para avanzar en la definición de marcadores moleculares ("*firma molecular*") asociados a la respuesta inmune inducida por la vacunación y protección contra la fiebre aftosa. La colaboración establecida con una de las principales empresas productoras de vacunas

animales de América Latina, nos permitió acceder a muestras relevantes de ensayos de eficacia y potencia contra FMDV en bovinos, que de otra manera no habría sido posible obtener dada las prohibiciones legales de nuestro país para trabajar con este virus y la complejidad del trabajo con este tipo de animales.

3.1.4.1 | Optimización de la logística de trabajo

La primera etapa del trabajo consistió en establecer una logística de trabajo que nos permitiera evaluar la respuesta transcripcional frente a la estimulación con antígeno de FMDV en sangre de bovinos. En esta etapa encontramos puntos críticos como la búsqueda de una preparación antigénica capaz de estimular una respuesta transcripcional en forma diferencial en sangre de animales vacunados, respecto al vehículo en el cual fue formulada y a su vez respecto al grupo de animales sin vacunar.

Otro punto importante fue definir cómo validar la aproximación experimental (estimulación de la sangre con el antígeno presente en la vacuna y evaluar la respuesta transcripcional), y cómo determinar si el antígeno utilizado era el adecuado para diferenciar los bovinos naïve, vacunados y protegidos contra el desafío de FMDV. Para validar todo el proceso, nos basamos en datos de la bibliografía que reportaban que el IFN-γ cumplía un rol importante en la actividad antiviral contra FMDV (Carr et al., 2013; Diaz-San Segundo et al., 2010; Moraes et al., 2007; Oh et al., 2012; Parida et al., 2006; Zhang et al., 2002), En consecuencia, utilizamos la expresión génica de esta citoquina y de otras tanto para optimizar las técnicas y protocolos como validar la preparación antigénica para estimular y la aproximación experimental.

En general, el perfil de citoquinas en respuesta a FMDV ha sido estudiado en ensayos de re-estimulación de sangre o PBMC con cuantificación de la forma proteica de las citoquinas (Bucafusco et al., 2015; Carr et al., 2013; Diaz-SanSegundo et al., 2010; Moraes et al., 2007; Oh et al., 2012; Parida et al., 2006). Sin embargo, para este trabajo la estrategia seleccionada fue cuantificar los niveles de expresión de los ARNm en sangre entera, dado que posteriormente en las mismas muestras se analizaría la respuesta transcripcional global por microarray. Además, es una estrategia que permite en cortos tiempos analizar el patrón de inducción o represión de citoquinas, fundamentalmente porque requiere una corta estimulación y porque permite la manipulación de un importante número de muestras. La cuantificación de la expresión de ARNm en el contexto de FMDV había sido pobremente reportado, por lo cual al inicio de los ensayos, nos basamos en dos reportes, uno el cual se reportaba el uso de la sangre entera de animales vacunados como medio de estudio de la producción de IFN-γ (a nivel de proteínas) (Parida et al., 2006b). El otro estudio mostraba el uso de la RT-qPCR para cuantificar los ARNm de citoquinas en el tejido linfoide asociado al paladar de bovinos portadores y no portadores (Zhang et al., 2006).

Por otra parte, definimos en qué tipo de muestra se analizarían los perfiles transcripcionales, dado que los ensayos de liberación de citoquinas pueden realizarse a partir de cultivos de sangre entera o de PBMC. En particular, los diferentes reportes plantean que no existe un consenso común sobre cuál es el método preferible, sin embargo, diferentes estudios han concluido que el cultivo de sangre entera es el medio más apropiado para estudiar la producción de citoquinas *in vitro*, en particular IFN-γ (Tabla 3-10). Los cultivos de sangre entera conservan las condiciones fisiológicas, como las proporciones celulares y las interacciones célula-célula, los factores de crecimiento, citoquinas y otros reguladores, mientras que los cultivos de PBMC han perdido esta característica con el proceso de purificación (Damsgaard et al., 2009; De Groote et al., 1992; Deenadayalan et al., 2013; Hartmann et al., 2016; Yaqoob and Newsholme, 1999). Sumado a ello, fue reportado que la purificación de PBMC resultó en una pérdida selectiva de linfocitos T γδ, lo que puede influir en los niveles de IFN-γ (Hartmann et al., 2016). Las respuestas individuales a nivel de la producción de diferentes citoquinas, tituladas mediante inmunoensayos, mostraron una menor variabilidad interindividual en cultivos de sangre entera, que la reportada en los cultivos de PBMC (Damsgaard et al., 2009).

Características	***Cultivo de sangre entera***	***Cultivo de PBMC***
Facilidad de realización	Cultivo inmediato	Separación celular que requiere tiempo y reactivos
Volumen de la muestra	Volúmenes pequeños de sangre	Requiere mayores volúmenes de sangre debido al proceso de purificación
Ambiente celular	Las proporciones celulares, factores de crecimiento, citocinas y otros reguladores están presentes en proporciones fisiológicas	Medios sintéticos con suero que contiene hormonas y nutrientes que pueden influir en la respuesta inmunológica de las células
Numero de células	Es desconocido y puede variar de un donante a otro	Se controla para ayudar a estandarizar el ensayo
Período de cultivo	Adecuado para cultivo a corto plazo, debido a la lisis de granulocitos en cultivos de más de 48 horas.	Cultivo a largo plazo posible debido al suministro suficiente de nutrientes dentro de los medios
Pérdida de células	Sin pérdida de células	Riesgo de pérdida celular selectiva durante la purificación
Apoptosis	Sin apoptosis en cultivo a corto plazo	Aumento de la apoptosis que puede enmascarar la intensidad de las respuestas inmunológicas debido a los niveles más bajos de citocinas producidas

Tabla 3.10. Ventajas y desventajas de la sangre entera en comparación con los cultivos de PBMC para los ensayos de liberación de citoquinas. Tomado y adaptado de (Hartmann et al., 2016)

Como parte de la optimización, cuantificamos los niveles de expresión del ARNm de IFN-γ en sangre entera y en PBMC purificados y pudimos observar que los niveles son similares entre ambos tipos de muestra. En consecuencia, basándonos en la bibliografía y en estos resultados optamos por realizar todos los ensayos a partir de sangre entera. Sumado a esto, consideramos que una menor manipulación es una ventaja para el análisis a nivel transcripcional de las respuestas inmunes, dado que la menor manipulación evita que genes vinculados con la muerte celular y/o apoptosis se induzcan e interfieran con el análisis frente al antígeno. Por otra parte, la menor manipulación nos permitió trabajar simultáneamente con un

importante número de muestras que en cada experimento rondó los 100 cultivos. En suma, para analizar la respuesta transcripcional frente al antígeno de FMDV logramos un método que simplifica el proceso mediante la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de IFN-γ en respuesta a la estimulación *in vitro* de sangre entera.

3.1.4.2 | IFN-γ como marcador de vacunación y protección contra FMDV

El análisis del perfil de expresión génica de citoquinas representativas del repertorio de células T (IFN-γ, IL-17, IL-4 e IL-10) por RT-qPCR, mostró que la vacunación induce la expresión específica de IFN-γ. En todos los ensayos analizados en esta tesis observamos que la expresión de esta citoquina fue inducida en bovinos vacunados, pero no así en los bovinos naïve. A partir de este resultado, pudimos concluir y confirmar que la expresión del ARNm de IFN-γ, luego de la estimulación de la sangre, es un buen marcador de la vacunación contra FMDV a los 30 dpv. Estos resultados, están en concordancia con lo reportado en bovinos sobre la importancia del rol del IFN-γ en respuesta antiviral inducida por la vacunación contra FMDV (Carr et al., 2013; Oh et al., 2012, 2006; Parida et al., 2006b). Estudios previos en bovinos realizados con la vacuna tetravalente utilizada en esta tesis (producida por la empresa colaboradora) mostraron una importante respuesta de IFN-γ (proteína) contra los antígenos de cada serotipo a los 30 dpv, mientras que los animales naïve no mostraron reacción frente a la estimulación de ninguna de las cepas de FMDV analizadas (Bucafusco et al., 2015). Además, esta citoquina ha sido relacionada con respuestas innatas y antivirales al FMDV *in vivo* (Toka et al., 2011) e *in vitro* (Zhang et al., 2002). La capacidad antiviral del IFN-γ, junto con la de los IFN tipo I, también fue demostrada *in vivo* en cerdos (Diaz-SanSegundo et al., 2010; Moraes et al., 2007). Del mismo modo, en ovinos fue igualmente reportado que las vacunas contra FMDV inducen la producción de IFN-γ circulante e inhiben la replicación local del virus previniendo el estado portador en las ovejas. Los autores sugirieron que la respuesta sistémica de IFN-γ podría ser un indicador útil de la capacidad de una vacuna contra FMDV de inducir inmunidad estéril en la que se previene el estado portador (Barnett et al., 2004). La producción de IFN-γ específica en sangre total proveniente de ganado vacunado, ha sido asociada a la activación de células T $CD4^+$ específicas de FMDV, las cuales serían las responsables de colaborar para inducir las respuestas neutralizantes de anticuerpos (Carr et al., 2013; Oh et al., 2012). Por otra parte, fueron detectadas células T $CD4^+$ de memoria productoras de IFN-γ, en respuesta al antígeno de FMDV, a los 180 dpv en sangre entera de bovinos vacunados (VanLierop et al., 1995). Células T $CD8^+$ citotóxicas también tienen la capacidad de producir IFN-γ en respuesta a antígenos de FMDV (Guzman et al., 2008). Además, se ha sugerido que la producción temprana de IFN-γ probablemente provenga de células NK activadas por citoquinas derivadas de macrófagos como parte de la respuesta inmune innata contra este virus (Patch et al., 2014).

Cuando nos centramos en la respuesta protectiva asociada a la vacunación, observamos que los bovinos vacunados y protegidos del Exp. 8 expresaron mayores niveles de IFN-γ que los vacunados no protegidos. Este resultado nos permitió sugerir que sería posible correlacionar los niveles de expresión del ARNm de IFN-γ con la protección efectiva inducida por la vacuna previo al desafío. La falta de significancia estadística observada en el Exp. 10 podría ser atribuida a variación intergrupal en los niveles de expresión de IFN-γ en ambos grupos de animales, dicha variación ya había sido observada entre los animales que han recibido la misma vacuna y en la misma dosis (Bucafusco et al., 2015; Oh et al., 2012). Sin embargo, esta variación podría ser explicada en función de que cerca del 60% de los bovinos vacunados y no vacunados se vuelven portadores de FMDV. La prevalencia de la persistencia del virus fue similar en el ganado vacunado y no vacunado, a pesar de que el ganado vacunado ha sido protegido de enfermedad clínica (Oh et al., 2012; Stenfeldt et al., 2016b). El estado portador con una sintomatología sub-clínica se establece entre los 21 y 28 días luego del desafío de animales vacunados o de la infección natural. Los animales no portadores se caracterizan por expresar altos niveles de IFN-γ a diferencia de los portadores que producen bajos niveles de esta citoquina (Oh et al., 2012; Parida et al., 2006). Stenfeldt y colaboradores han reportado recientemente que la eliminación de FMDV de la mucosa nasofaríngea se asocia con la activación de la inmunidad mediada por células T ($CD8^+$), mientras que en el estado portador se asocia a la inhibición de la activación de las células T y la promoción de la polarización Th2 (Stenfeldt et al., 2017). Previamente, este grupo de investigación demostró que la divergencia, entre el estado portador y los animales que eliminaron el virus, se produjo 10 días después de la infección en el ganado vacunado con una vacuna recombinante a adenovirus, y 21 días en los animales no vacunados (Stenfeldt et al., 2016b).

En general, estos reportes que asocian el estado portador con la producción de IFN-γ, determinan su expresión luego de que el animal ya había sido confirmado como portador o no portador. En particular, Parida y colaboradores estudiaron el perfil de liberación de esta citoquina en función de la capacidad volverse portadores luego del desafío, y reportaron una tendencia a los 21 dpv (previo al desafío) de los animales, que serán no portadores, a producir una mayor cantidad de IFN-γ en relación con aquellos que serán portadores luego del desafío (Parida et al., 2006b). A diferencia del trabajo de Parida, nosotros determinamos el perfil génico de esta citoquina en animales protegidos y no protegidos (estado definido luego del desafío) por lo que sugerimos que la variación que encontramos pueda deberse a que algunos animales podrían ser portadores y otros no. No obstante, para confirmar que esta citoquina puede ser utilizada como un predictor de protección contra el estado portador, sería necesario analizar en nuestro sistema de trabajo animales que han sido portadores vs no portadores.

Por otra parte, debemos considerar que los resultados de la expresión de IFN-γ de los Exp. 8 y 10 son en respuesta a diferentes vacunas (monovalente y tetravalente) que tienen en común el

serotipo O1 Campos, contra el cual fue analizada la eficacia de estas vacunas. En consecuencia, podría haberse inducido una respuesta distinta o menor al administrar vacunas con diferente composición antigénica, explicando que en el Exp. 8 se haya observado una respuesta significativa de IFN-γ, mientras que en el Exp. 10 no se observó. En este sentido, Blanco y colaboradores evaluaron el efecto de la multivalencia ratones vacunados con dendrímeros de dos (B_2T) o cuatro (B_4T) copias de un epítope B en VP1 unido a un epítope T en 3A,ambos del serotipo O de FMDV. Los autores demostraron que si bien la multivalencia resultó ser ventajosa para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes y una liberación óptima de IFN-γ, la construcción bivalente de B_2T provocó respuestas específicas de células B y T similares o incluso mejores que el B_4T tetravalente (Blanco et al., 2013).

A continuación, investigamos si la expresión del ARNm de IFN-γ podría correlacionarse con la respuesta de anticuerpos. En este sentido y como fue mencionado, si bien hay una tendencia a reconsiderar al título de anticuerpos como único correlato de protección e incluir marcadores de inmunidad de las células T, como la producción de IFN-γ (Robinson et al., 2016), los reportes no son concluyentes. En particular, Oh y colaboradores compararon bovinos vacunados protegidos *vs* no protegidos y demostraron que el análisis del título de anticuerpos neutralizantes conjuntamente con los niveles de IFN-γ tienen una mejor correlación con la protección clínica después de la vacunación, que si utiliza como único predictor el título de anticuerpos. Asimismo, reportaron que la respuesta de anticuerpos no reflejó el estado portador de los animales, mientras que el nivel de IFN-γ fue significativamente mayor en los no portadores (Oh et al., 2012). Contrariamente, nuestros resultados no mostraron una correlación entre estos dos parámetros inmunológicos a los 30 dpv, tanto si consideramos los bovinos de los tres experimentos en forma conjunta (7, 8 y 10) como si analizamos los Exp 8 y 10 individualmente. Estos resultados estuvieron en concordancia con reportes previos que tampoco encontraron correlación entre estos parámetros, más allá de las diferencias en las estrategias utilizadas, como por ejemplo que cuantifican la forma proteica del IFN-γ mientras que nosotros determinamos la expresión génica del IFN-γ (Carr et al., 2013; Parida et al., 2006b). Además, estos reportes titulan anticuerpos neutralizantes y nuestros datos provienen de la titulación de anticuerpos por LPB-ELISA. Las autoridades de la sanidad animal en Argentina, han establecido al parámetro EPP como el método alternativo indirecto para analizar la potencia, el que está basado en estudios de correlación específicos entre los resultados de las pruebas PPG realizadas en ganado y del LPB-ELISA. Este parámetro EPP estima la probabilidad de que el ganado primo-vacunado esté protegido contra el desafío a los 90 dpv. Sin embargo, el EPP fue definido relacionando los títulos de anticuerpos medidos por LPB-ELISA a los 60 dpv con los porcentajes de protección en la prueba PPG a 90 dpv frente al desafío *in vivo*, del mismo grupo de animales (Maradei et al., 2008; OIE, 2018a; Robiolo et al., 1995). Esto plantea la cuestión de qué otros factores intrínsecos de la respuesta inmune de

huésped podrían estar involucrados en la determinación de la magnitud de la respuesta de las células T productoras de IFN-γ a la vacunación.

También fueron analizadas las expresiones de los ARNm de las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-17, y nuestros resultados mostraron que sólo IL-10 fue inducida significativamente en respuesta al antígeno de FMDV en bovinos vacunados. El rol de esta citoquina en el contexto de la vacunación contra FMDV no está claro dado que la información disponible es escasa y proviene de estudios con diferentes preparaciones vacunales realizados en cerdos y ratones, sin embargo establecen, al igual que nuestros resultados, que la IL-10 se produce en animales vacunados en respuesta a la estimulación con el antígeno de FMDV (Barnard et al., 2005; Eblé et al., 2006; Lei et al., 2019). Por otra parte, esta citoquina ha sido asociada a la respuesta inmune producida durante la infección aguda con FMDV, y su rol en cerdos y ratones estaría asociado con un estado transitorio de supresión inmune durante la infección con linfopenia y supresión generalizada de las respuestas T (Díaz-San Segundo et al., 2009; Langellotti et al., 2012; Reid et al., 2011). Esta inmunosupresión se ha asociado con el mantenimiento de infecciones crónicas virales y bacterianas (Flynn et al., 2011; Rojas et al., 2017; Witchell et al., 2010). Estudios en ratones demostraron que, mediante un proceso dependiente de IL-10, las DCs infectadas con FMDV estimularían a las células B innatas $CD9^+$ para que produzcan IgM neutralizantes T-independientes (Ostrowski et al., 2007). En cambio, en bovinos el panorama es menos claro y existe evidencia contradictoria respecto a si se induce linfopenia e inmunosupresión durante la infección aguda con FMDV y si es producto de IL-10 e IFN tipo I (Sei et al., 2016; Windsor et al., 2011).

En cuanto a la IL-17, ha sido muy pobremente relacionada con FMDV y la información reportada es escasa, parcial y no permite sacar conclusiones sobre un posible rol en respuesta inmune contra FMDV. En particular, Zou y colaboradores describieron que no se induciría una respuesta de células T $CD8^+$ productoras de IL-17 en respuesta a una vacuna a ADN adyuantizada con IL-9 contra FMDV (Zou et al., 2010). Nuestros resultados sobre esta citoquina mostraron una tendencia donde observamos los bovinos vacunados expresarían mayores niveles de IL-17 que los naïve, sin embargo, la diferencia no resultó significativa debido a que animales algunos naïve expresaban altos niveles de esta citoquina.

La IL-4, con un claro rol en la iniciación y expansión de las respuestas inmunes humorales (Park et al., 2016), ha sido asociada con la vacunación contra FMDV (Dar et al., 2015; Jayeshbhai et al., 2018; Lei et al., 2019; Yang et al., 2018). Además, ha sido reportado que vacunas convencionales, como las utilizadas en esta tesis, formuladas con aceite mineral (Montanide) y emulgente como adyuvante, mostraron la capacidad de inducir altos niveles de citoquinas Th1 y Th2 en los días posteriores a la segunda dosis de la vacuna, o a la estimulación antigénica (Park et al., 2016). Contrariamente, a estos reportes en este trabajo no pudimos determinar un patrón de respuesta al antígeno asociado a la vacunación contra FMDV

dado que los animales vacunados y naïve expresaban niveles similares del ARNm. Dar y colaboradores evaluaron la expresión de citoquinas a nivel de ARN y proteínas y encontraron el pico de inducción máximo del ARNm de IL-4 en respuesta al antígeno de FMDV fue a las 24 h (Dar et al., 2015). Nuestros resultados fueron obtenidos luego de 6 h de estimulación antigénica, y si bien Dar y colaboradores reportan que a partir de las 6 h, los animales vacunados expresan niveles de IL-4 mayores que los sin vacunar. En consecuencia, debemos considerar la posibilidad de que no analizáramos el tiempo de estimulación adecuado para cuantificar esta citoquina por RT-qPCR, y además de que al tratarse de vacunas diferentes ciertamente la capacidad de inducir la expresión de citoquinas puede variar.

3.1.4.3 │ "*Firma molecular*" en la vacunación contra FMDV

Para avanzar en la de búsqueda de marcadores moleculares de la inmunidad y la protección asociados a la vacunación contra la fiebre aftosa utilizamos dos estrategias experimentales. Una enfocada en identificar genes diferencialmente expresados en respuesta a la vacunación (marcadores de vacunación), y la otra estrategia dirigida a identificar marcadores asociados a la protección inducida por la vacunación (marcadores de la respuesta protectiva).

A priori, estas estrategias suponían una gran variabilidad por tratarse de animales a campo provenientes de ensayos diferentes, sin embargo el análisis de clúster, realizado a partir de los niveles de logQ, mostró que en ambas comparaciones los animales se agruparon en función de su condición (naïve, vacunado, y protegido o no protegido) (Figs. 3-13 y 3-15). Estos resultados nos brindaron una certeza sobre la calidad de los ensayos, y la estrategia de selección de los animales que apuntó a que, más allá de la variabilidad entre los bovinos, éstos pudieran ser tratados como réplicas biológicas.

Los bovinos para analizar la respuesta transcripcional fueron seleccionados de forma que los niveles de expresión del ARNm de IFN-γ fueran similares entre sí de acuerdo a su condición (vacunados, naïve, vacunados protegidos y no protegidos), en consecuencia era esperable que este gen surgiera como inducido en ambas comparaciones. Sin embargo, el IFN-γ sólo surgió en la comparación de bovinos vacunados protegidos *vs* no protegidos, y su expresión fue validada por qPCR. La ausencia de la expresión de este gen en vacunados *vs* naïve, posiblemente pudiera deberse a la dispersión de los valores de LogQ en el grupo vacunados dado por RT-qPCR fueron observadas las diferencias entre ambos grupos. Además, nuestros resultados mostraron que el término GO "*regulación positiva de la producción de IFN-γ*" surgió como enriquecido, aportando una certeza sobre el rol de esta citoquina como biomarcador de vacunación contra FMDV. A diferencia de la comparación vacunados *vs* naïve, los datos obtenidos del microarray de protegidos *vs* no protegidos no nos permiten concluir si el IFN-γ es un marcador de la protección contra FMDV, dado que las muestras analizadas por ambas

técnicas (RT-qPCR y microarray) provienen del Exp. 8. Para determinar si la expresión del IFN-γ podría ser un buen marcador molecular de protección sería necesario analizar un mayor número de animales provenientes de diferentes ensayos de vacunación/desafío.

En una segunda etapa, a partir de los genes expresados diferencialmente en ambas comparaciones de microarrays, seleccionamos los posibles candidatos para la "*firma molecular*" y validamos su expresión por RT-qPCR. Los genes validados, definimos dos "*firmas moleculares*" una asociada a la vacunación contra FMDV y la otra a la respuesta protectiva. Estas firmas nos permiten diferenciar bovinos vacunados de bovinos naïves, y vacunados protegidos de los no protegidos, con el objetivo de emplearlas para determinar la eficacia de estas vacunas de forma más certera y rápida.

Diversos estudios han empleado la Biología de sistemas y las tecnologías *high-throughput* para investigar "*firmas moleculares*" inducidas por una amplia gama de vacunas humanas con el objetivo de identificar firmas de inmunidad protectiva y delinear mecanismos moleculares generales de la inmunidad asociada a las vacunas. Entre ellas, las más estudiadas y para las cuales se ha logrado identificar estas firmas son las vacunas contra la fiebre amarilla (Querec et al., 2009), influenza (Nakaya et al., 2015), meningococo (Li et al., 2014), HIV (Zak et al., 2012), y malaria (Moncunill et al., 2020). Estas firmas fueron identificadas en forma temprana luego de la inmunización, donde se tomó sangre y se estudió la respuesta transcriptómica global. Por el contrario, las firmas definidas en nuestro trabajo fueron identificadas a los 30 días de que los animales recibieran la vacuna, por lo cual ambas firmas fueron definidas en respuesta al antígeno de FMDV. Una estrategia similar a nuestro trabajo fue empleada para explorar la respuesta inmune inducida una vacuna contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo. Cerdos vacunados y clasificados en altos o bajos respondedores, según la cantidad de células secretoras de IFN-γ específicas, se les estudió perfil transcripcional en PBMC estimuladas con la cepa vacunal, para identificar genes, funciones moleculares y vías biológicas asociadas con la respuesta a la vacuna (Ait-Ali et al., 2016).

A nivel de bovinos, la gran mayoría de los reportes que surgen en la bibliografía, analizan la respuesta transcripcional global con la finalidad de identificar interactomas entre estos animales y diferentes patógenos. A partir de estos interactomas, se han definido "*firmas moleculares*" con el objetivo de desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico y/o terapias contra patógenos, como ser *Mycobacterium bovis* (Alcaraz-López et al., 2020; Kieran G Meade et al., 2007), o para ser empleadas como herramienta para mejorar el diseño racional de vacunas como por ejemplo contra las infecciones por *Brucella melitensis*, *Mycobacterium avium* paratuberculosis, *Salmonella enterica* Typhimurium (Adams et al., 2011), o *Rhipicephalus microplus* (Robbertse et al., 2020). En el contexto de FMDV, la mayoría de los reportes de respuestas transcripcionales analizan las características que determinan que un animal sea portador o no

del virus (Han et al., 2018; Lv et al., 2018; Pacheco et al., 2015; Stenfeldt et al., 2017, 2016b; Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2017).

En el contexto de las vacunas veterinarias, los reportes que definen "*firmas moleculares*" que correlacionan y predigan respuestas inmunes inducidas por la vacunación son extremadamente escasos. En el contexto de FMDV, surgen sólo dos reportes que evalúan el transcriptoma en respuesta a la vacunación. En uno de ellos, analizaron la respuesta transcripcional, a nivel de sangre periférica, de ovinos que recibieron la vacuna inactivada contra el serotipo O1 Manisa FMDV (iFMDV) o la vacuna a adenovirus (Ad5-FMDV). El análisis de enriquecimiento fue realizado utilizando el Módulo de Transcripción de Sangre (BTM, del inglés: *Blood Transcription Modules*) (Jouneau et al., 2020), herramienta bioinformática descrita para analizar la respuesta transcripcional temprana de vacunas humanas. El BTM fue desarrollado a partir de la integración de bases de datos de sistemas en contextos biológicos específicos y de diferentes transcriptomas de sangre humana disponibles públicamente, como una alternativa a los métodos "convencionales" de análisis de procesos y vías biológicas (Li et al., 2014). A partir del BTM adaptado y curado para la especie ovina (Braun et al., 2018), Jouneau y colaboradores demostraron que varios módulos, incluidos los de respuesta de células T y B, y el ciclo celular, se correlacionan con la respuesta de anticuerpos a largo plazo. Sobre la base de estos módulos modificados definieron posibles "*firmas transcripcionales*" tempranas asociadas con la eficacia de las vacunas iFMDV y Ad5-FMDV (Jouneau et al., 2020). A diferencia de este estudio, nuestra estrategia fue identificar genes diferencialmente expresados para conformar ambas "*firmas moleculares*", tal como ha sido descrito para ciertas vacunas humanas, como por ejemplo: contra el virus Influenza (Gonçalves et al., 2019), sarampión (Haralambieva et al., 2016), HIV (Ehrenberg et al., 2019), y HPV (García-Piñeres et al., 2009).

Por otra parte, Eschbaumer y colaboradores caracterizaron las alteraciones del transcriptoma asociadas con el estado de portador del FMDV en bovinos vacunados (con vacuna recombinante de FMDV serotipo A) y no vacunados, que posteriormente fueron desafiados con FMDV A24 Cruzeiro. Los autores sugieren que la persistencia del FMDV en el tejido nasofaríngeo bovino puede estar asociada a la inhibición de la apoptosis, a una polarización hacia Th2 mediada por prostaglandina-E2, y a la supresión local de la inmunidad antiviral mediada por células T reguladoras inducibles. Por otro lado, se sugiere que los efectos del estado de portador del FMDV son más profundos que los efectos de la vacunación, dado que no observaron diferencias significativas entre las transcriptomas de portadores vacunados y no vacunados a 21 dpv. Estos resultados dejarían en evidencia la importancia de definir correlatos de protección asociados a la vacuna contra FMDV más precisos, dado que el establecimiento del estado portador como los respondedores deficientes a la vacuna representan un cuello de botella para la efectividad de la vacuna. En este sentido, las "*firmas moleculares*" definidas en este trabajo surgen como posibles correlatos de vacunación y de respuesta protectiva, y en consecuencia para probar y validar la solidez de estas firmas es fundamental que sean

analizadas, tanto en experimentos de vacunación independientes, realizados en momentos diferentes al del estudio inicial, como en experimentos donde se identifique los bovinos portadores de FMDV.

En suma, en este trabajo se identificaron "*firmas moleculares*" asociadas a la vacunación y a la respuesta protectiva contra FMDV en bovinos, que podrán ser empleadas para predecir la eficacia de estas vacunas acelerando las pruebas de control de las mismas. Por otra parte, nuestros resultados, sobre funciones y vías biológicas asociadas a la vacunación efectiva contra contra FMDV, nos abre un abanico extremadamente útil para estudiar los mecanismos inmunes que subyacen a la inmunidad de las vacunas destinadas a grandes animales de importancia veterinaria.

3.2 ENFERMEDADES CLOSTRIDIALES

Las vacunas han sido utilizadas exitosamente durante décadas para controlar las enfermedades clostridiales (Brown et al., 1976; Lewis, 2011). En general, se acepta que 2 dosis de vacuna administradas con 4 a 6 semanas de diferencia, y una revacunación anual son suficientes para conferir protección. El título de anticuerpos contra antígenos de *Clostridium* se ha considerado durante mucho tiempo como el principal correlato de la protección inducida por la vacunación. De hecho, las agencias reguladoras han establecido valores específicos de los niveles de anticuerpos contra cada especie de *Clostridium* para la aprobación de liberación de lotes de vacunas comerciales (Consejo de Europa, Europa, 2017; Heldens et al., 2008; US Government Publishing Office, 2017). Sin embargo, las vacunas disponibles en el mercado difieren en el número de especies de *Clostridium* incluidas como en el tipo de adyuvante, por lo que pueden variar significativamente en la capacidad para inducir anticuerpos específicos contra cada una de las diferentes especies de *Clostridium* (Crichton et al., 1986; Green et al., 1987). A pesar de ello, los estudios disponibles que evalúan dicha respuesta humoral son pocos y parciales. Sumado a ello, reportes sobre el estudio de la respuesta celular inducida por las vacunas policlostridiales son prácticamente inexistentes.

En este contexto, nos surgió la pregunta de si es posible establecer correlatos inmunológicos más precisos asociados a la protección inducida por las vacunas policlostridiales. Para ello, en esta tesis nos centramos en estudiar la respuesta humoral y celular inducida por las vacunas policlostridiales en ovinos y bovinos. Posteriormente, nos orientamos a evaluar la protección inducida por la vacuna policlostridial contra uno de los clostridios de mayor importancia epidemiológica (*C. chauvoei*) en bovinos. Para ello, fueron evaluados un ensayo de vacunación en ovinos y bovinos, y un ensayo de vacunación-desafío realizado en bovinos. Estos ensayos fueron realizados en Uruguay, por lo que fue requerida una logística de menor complejidad que la del modelo aftosa. Sin embargo, fue necesario poner a punto protocolos que nos aseguraran mantener la calidad de las muestras de sangre extraídas de estos animales.

3.2.1 | ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN CONTRA *Clostridium* spp.

Para estudiar la respuesta inmune inducida por la vacunación policlostridial nos centramos en dos ensayos de vacunación contra *Clostridium* spp. (Ensayos A y B). A partir de los cuales evaluamos la respuesta humoral contra a todos los componentes de las vacunas clostridiales y

analizamos la evolución temporal de dicha respuesta en ovinos y bovinos. Además, nos enfocamos en analizar la respuesta celular inducida por la vacunación mediante el análisis del perfil de expresión génica de citoquinas frente a antígenos específicos. Los resultados son presentados por ensayo y por especie de animal.

3.2.1.1 | *Ensayo A*

En este primer ensayo, ovinos y bovinos recibieron vacunas policlostridiales y fueron estudiados a lo largo de un año. En el ensayo fueron incluidas dos tipos de vacunas multivalentes: 1) una de referencia, que ha estado en el mercado durante años y es una de las más reconocidas en el área; y 2) una vacuna experimental, con formulación similar a la vacuna control, preparada por la empresa colaboradora. Ambas vacunas contienen *C. chauvoei, C. haemolyticum*; *C. novyi* tipo B, *C. perfringens* tipo A, B y D, *C. septicum*, *C. sordelli* y *C. tetani*. Además, fueron incluidos animales centinela, sin vacunar, que denominamos animales control. Todos los animales fueron sangrados regularmente por personal de la empresa, y la sangre fue procesada en nuestro laboratorio para analizar la respuesta humoral y celular (Fig. 3-20 y Sección 2.1.2 de M&M).

Figura 3-20. Esquema de ensayo de vacunación policlostridial en ovinos y bovinos. Los animales fueron divididos aleatoriamente en: grupo Vacuna Experimental (n=10), grupo Vacuna Referencia (n=10), y grupo Control (n=5). Las vacunas fueron administradas en dos dosis (fechas verdes) según las recomendaciones del fabricante. Los animales fueron sangrados a lo largo del año a diferentes tiempos post-vacunación (señalados con flechas rojas).

3.2.1.1.1 | *Análisis de la respuesta humoral*

El punto de partida para titular la respuesta de anticuerpos fue optimizar inmunoensayos (ELISA) específicos contra cada uno de los antígenos clostridiales incluidos en las vacunas y para ambas especies de destino (bovinos y ovinos). Para la optimización fueron seguidos protocolos establecidos en nuestro laboratorio, en los cuales se fueron poniendo a punto cada una de las etapas del ELISAs (Tabla 3-12).

Los antígenos utilizados para sensibilizar los ELISAs específicos fueron los mismos antígenos con los que se formuló la vacuna experimental. Los antígenos sensibilizantes de *C. chauvoei* y *C. haemolyticum* fueron preparados, a partir de las bacterinas, mediante ciclos de sonicados y

posterior centrifugado (M&M). Los sistemas de bloqueo y buffer, así como los tiempos y concentraciones, fueron ajustados para cada una de las cepas y especies (Sección 2.7, M&M).

Etapa		Comentarios
1) Sensibilización	a) Elección Antígeno	Depende de cada cepa clostridial
	b) Determinación Concentración	Depende del Ag elegido
	c) Volumen de reacción	Depende de la sensibilidad del inmunoensayo
	d) Condiciones incubación	Buffer de sensibilizado y tiempo/temperatura
2) Sistema Buffer	a) Buffer de Bloqueo	Se evaluaron diferentes sistemas: BSA, OVA, Leche descremada, Leche de soja y PBS-T
	b) Buffer de Dilución de anticuerpos	
3) Sueros	a) Evaluación de diferentes diluciones de los sueros problemas de animales vacunados y testigos	Se realiza una titulación de estos sueros con una curva patrón por medio de la determinación de unidades arbitrarias.
	b) Evaluación de sueros para determinar sueros patrones	
4) Conjugado	a) Determinación concentración del conjugado α- Bovine IgG -PO (Sigma) en el ELISA de Bovinos	
	b) Determinación concentración del conjugado α- Sheep IgG -PO (Sigma) en el ELISA de Ovinos	
	c) Condiciones incubación	Buffer y tiempo/temperatura
5) Revelado	a) Determinación del tiempo de incubación del ODP-Sigma Fast	
6) Análisis de datos		

Tabla 3-12. Etapas del ELISA que fueron optimizadas para cada una de las cepas clostridiales analizadas en ambas especies de animales de destino.

Para titular los anticuerpos, interpolamos los valores de OD de los sueros problema en una curva estándar, en Unidades Arbitrarias (UA). Las curvas estándar fueron definidas para cada antígeno y especie, y construidas a partir de diluciones seriadas de un pool de sueros día 36 post-vacunación (Sección 2.7, M&M). Entendemos que si bien se podría haber utilizado una sola dilución para interpolar y calcular el UA/ml para cada suero, seleccionar 3 diluciones diferentes y promediarlas generó un valor título más preciso

Para cada una de las especies veterinarias, y cada uno de los antígenos, se definió un valor de corte (*cut-off*), que representa los niveles basales de anticuerpos en la población estudiada, y permite por tanto definir los aumentos específicos asociados a la vacunación. Para el cálculo de cada valor de corte, se evaluaron los niveles de anticuerpos específicos de 45 ovinos y 45 bovinos sin historia previa de vacunación. El "*cut-off*" para cada antígeno fue establecido como el valor promedio del título de anticuerpos específico más 3 desvíos estándar (+3DS). De estos 45 ovinos y 45 bovinos, se seleccionaron al azar los 25 animales de cada especie que se utilizaron en los experimentos.

En suma, para cumplir con este objetivo fueron desarrollados 18 ELISAs, lo que nos permitió contar con una técnica para cuantificar específicamente anticuerpos contra las cepas clostridiales en ovinos y bovinos. En este contexto, fue evaluada la variación individual de la respuesta humoral inducida por la vacunación con cada una de las vacunas, y la evolución temporal de anticuerpos específicos durante un período de un año después de la vacunación.

I│ Ensayo en ovinos

a) Análisis de la respuesta la respuesta de anticuerpos específica

La respuesta individual de anticuerpos contra las diferentes especies de *Clostridium* fue evaluada a los 0, 36 y 90 días después de la vacunación. Las comparaciones estadísticas fueron evaluadas en todos los tiempos analizados y entre grupos de animales, y aquellos que mostraron diferencias significativas son indicados en la Figura 3-20. Previo a la vacunación (día 0), todos los ovinos mostraron niveles de anticuerpos por debajo del valor de "*cut-off*". Después de 2 dosis de vacuna (36 dpv), todos los animales que recibieron la vacuna experimental mostraron una respuesta de anticuerpos positiva, aunque con una gran dispersión. Esta respuesta de anticuerpos fue observada contra todas las especies de *Clostridium*, excepto para *C. septicum*. Una imagen similar fue obtenida con los ovinos que recibieron la vacuna de referencia, aunque en este grupo, la respuesta contra los antígenos de *C. perfringens* tipo A o C y *C. tetani* no fue completa observándose que algunos animales no respondieron positivamente. La respuesta individual contra *C. septicum*, fue diferente para los grupos vacunados, observándose que la gran mayoría de los animales del grupo vacuna experimental mostraron una respuesta de anticuerpos, mientras que sólo 3 de los 10 ovinos de la vacuna de referencia se seroconvirtieron (Fig. 3-21).

A los 90 dpv, las respuestas de anticuerpos mostraron una notable disminución, aunque con algunas diferencias entre los antígenos. Para la vacuna experimental, fue observado que todos los animales del grupo permanecieron seropositivos a 4 antígenos (*C. haemolyticum*, *C. perfringens* tipo A y D, y *C. novyi* B), mientras que para el resto de los antígenos sólo algunos animales fueron seronegativos. La respuesta contra la vacuna de referencia también mostró grandes variaciones entre individuos, y sólo la respuesta contra *C. haemolyticum* fue mantenida por encima del valor de "*cut-off*" para todos los animales. Los niveles de anticuerpos contra el antígeno de *C. septicum* a los 90 dpv mostraron que todos los animales, independientemente de la vacuna utilizada, estaban por debajo del "*cut-off*" (Fig. 3-21).

La comparación entre los grupos vacunados no mostró diferencias significativas en la respuesta inducida contra ninguno de los antígenos y en ninguno de los tiempos evaluados. La respuesta del grupo de control permaneció por debajo del valor de corte durante todo el estudio de acuerdo a lo esperado (Fig. 3-21).

Para identificar las principales tendencias en la variabilidad de la respuesta de anticuerpos entre los dos grupos de animales vacunados, se realizó un Análisis del Componente Principal (PCA) y un análisis de cluster. Los resultados del PCA mostraron que el primer componente principal representaba el 82,8% de la variación total de los datos, y la principal variable fue la respuesta a *C. tetani*, con un coeficiente de variación del 99,7%. El segundo componente principal representó el 13,1% de la variación, siendo la respuesta a *C. novyi* tipo B la variable que más contribuyó, con un coeficiente de variación del 93.5%, seguida de la respuesta a *C.*

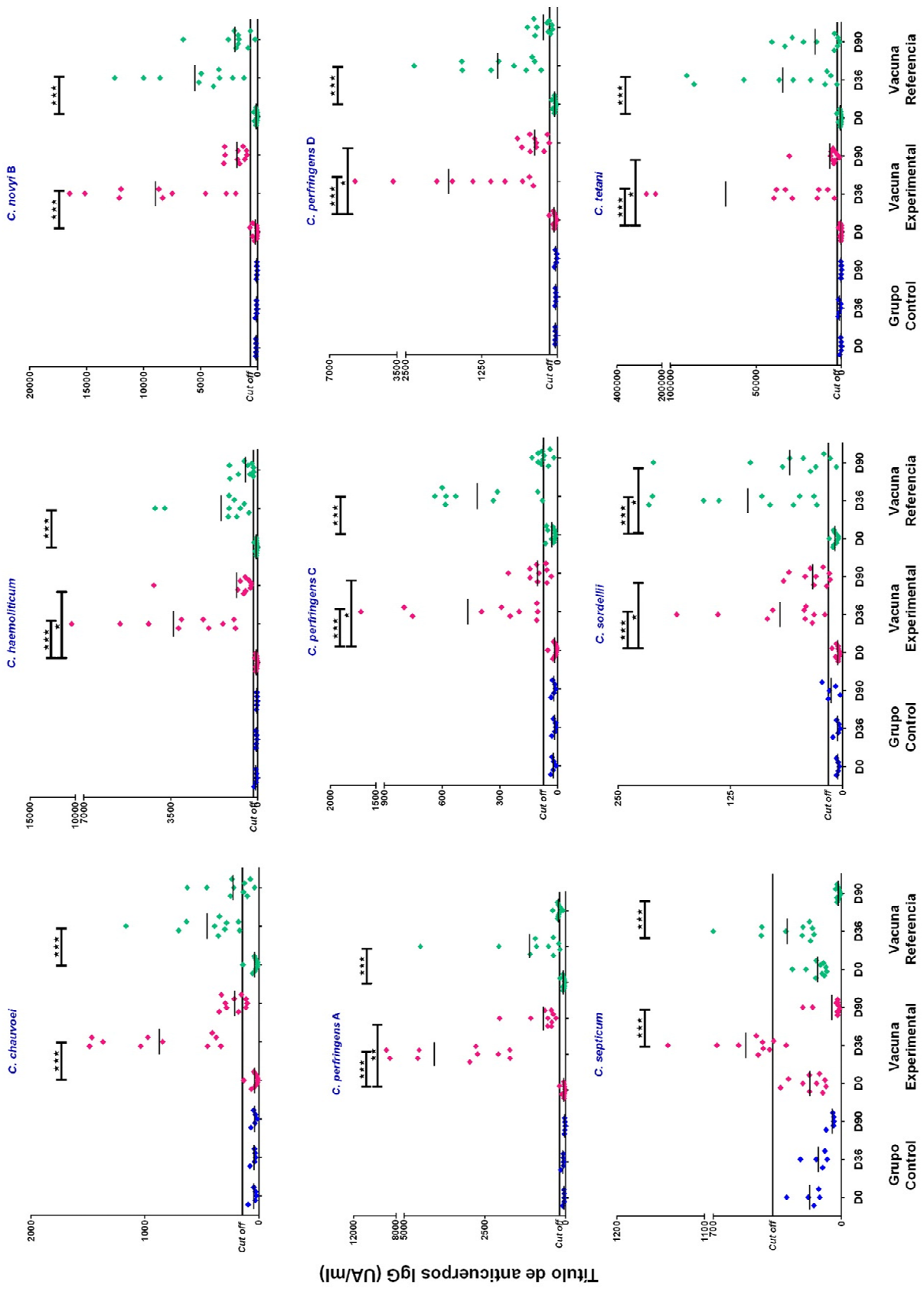

Figura3-21. Título de IgG total contra antígenos de *Clostridium* en sueros de ovinos inmunizados con vacuna experimental, de referencia o sin tratamiento (grupo control) del *Ensayo A.* Los resultados muestran las medias de los niveles de IgG a 0, 36 y 90 dpv. Cada punto representa un animal, siendo los puntos azules el grupo control, los rosados los que recibieron la vacuna experimental y los verdes la vacuna de referencia. Las diferencias significativas en las respuestas, dentro de un mismo grupo o entre grupos a diferentes tiempos post-vacunación son marcadas con asteriscos. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns * p <0.05; ** p <0,01; *** p <0,0001.

perfringens tipo A y C, con coeficientes de 22,6% y 17,5%, respectivamente (Fig. 3-21). Por otra parte, algunos animales que recibieron la vacuna experimental, presentaron una respuesta humoral diferencial. Los animales Nº 5 y 6, y 8 y 10 se ubicaron en los extremos positivo del "eje x", y en el positivo del " eje y", respectivamente (Fig. 3-22).

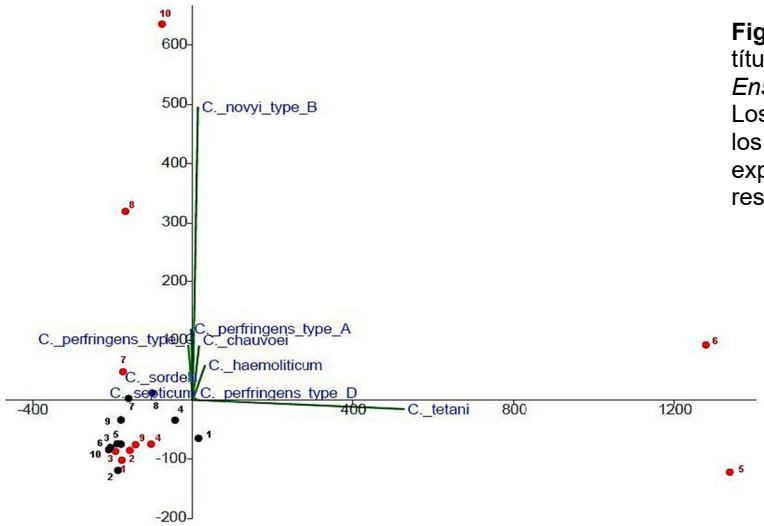

Figura 3-22. Análisis PCA sobre el título de anticuerpos en ovinos del *Ensayo A*, 36 días post-vacunación. Los puntos rojos y negros representan los animales que recibieron la vacuna experimental o de referencia, respectivamente.

Los cuatro animales considerados como altos respondedores mostraron una respuesta de anticuerpos significativamente aumentada contra *C. tetani* y *C. novyi* tipo B, respectivamente. Para confirmar si los animales presentaban diferentes capacidades de responder, fue realizado un análisis de cluster de todos los ovinos vacunados en función de las cepas clostridiales o en función del título de anticuerpos por animal (Fig. 3-23). El análisis mostró que la respuesta contra *C. tetani* y *C. novyi* tipo B se agrupó en forma separada. Las respuestas contra las demás cepas mostraron estar divididas en dos grupos; un grupo fue formado por *C. perfringens* tipo C, *C. perfringens* tipo A, *C. haemolyticum* y *C. chauvoei*, el otro por *C. sordellii*, *C. septicum* y *C. perfringens* tipo D (Fig. 3-23A). El análisis por animales arrojó que los 4 ovinos, que en el PCA surgían como posibles altos respondedores, se

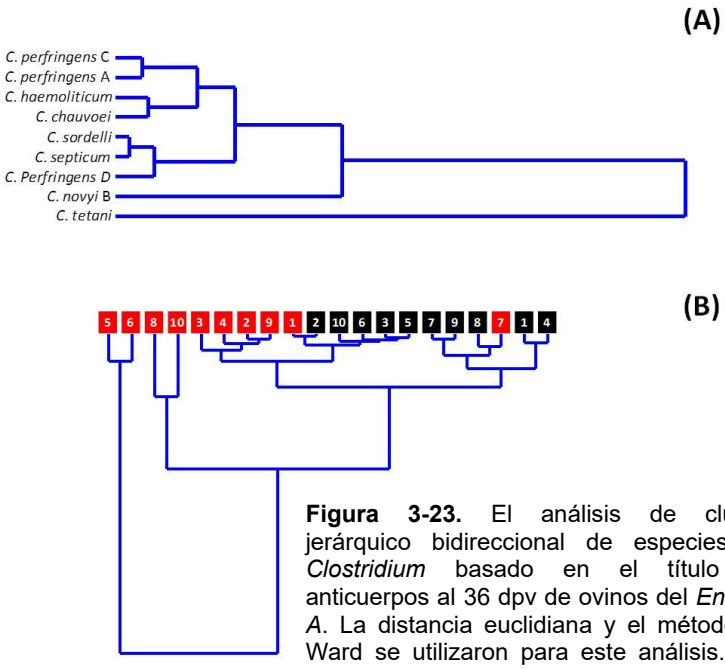

Figura 3-23. El análisis de cluster jerárquico bidireccional de especies de *Clostridium* basado en el título de anticuerpos al 36 dpv de ovinos del *Ensayo A*. La distancia euclidiana y el método de Ward se utilizaron para este análisis. (A). Los antígenos clostridiales fueron agrupados de acuerdo con el título de IgG observado en los animales vacunados. (B) Los animales fueron agrupado de acuerdo con el título de IgG contra diferentes *Clostridium* spp. Los cuadros rojos y negros corresponden a animales tratados con las vacunas experimentales y de referencia, respectivamente

agruparon en forma separada del resto de los ovinos vacunados (Fig. 3-23B) confirmándonos que estos 4 animales son altos respondedores

Para evaluar el impacto de los valores atípicos fueron eliminados los 4 altos respondedores del análisis PCA. El resultado reveló que el patrón de agrupamiento y las tendencias observadas con todos los animales siguió siendo muy similar, es decir, las respuestas de anticuerpos a *C. tetani* y *C. novyi* tipo B fueron significativamente diferentes de todas las otras especies de *Clostridium*, y los animales tratados con cualquier vacuna tendieron a agruparse en el PCA (datos no mostrados).

b) Evolución temporal de la respuesta humoral

Dados los bajos valores obtenidos en el día 90 dpv, la respuesta humoral inducida por las vacunas durante el período de un año, fue evaluada en pooles de sueros de cada grupo (Fig. 3-24). Los resultados mostraron que los niveles de anticuerpos en suero después del día 90

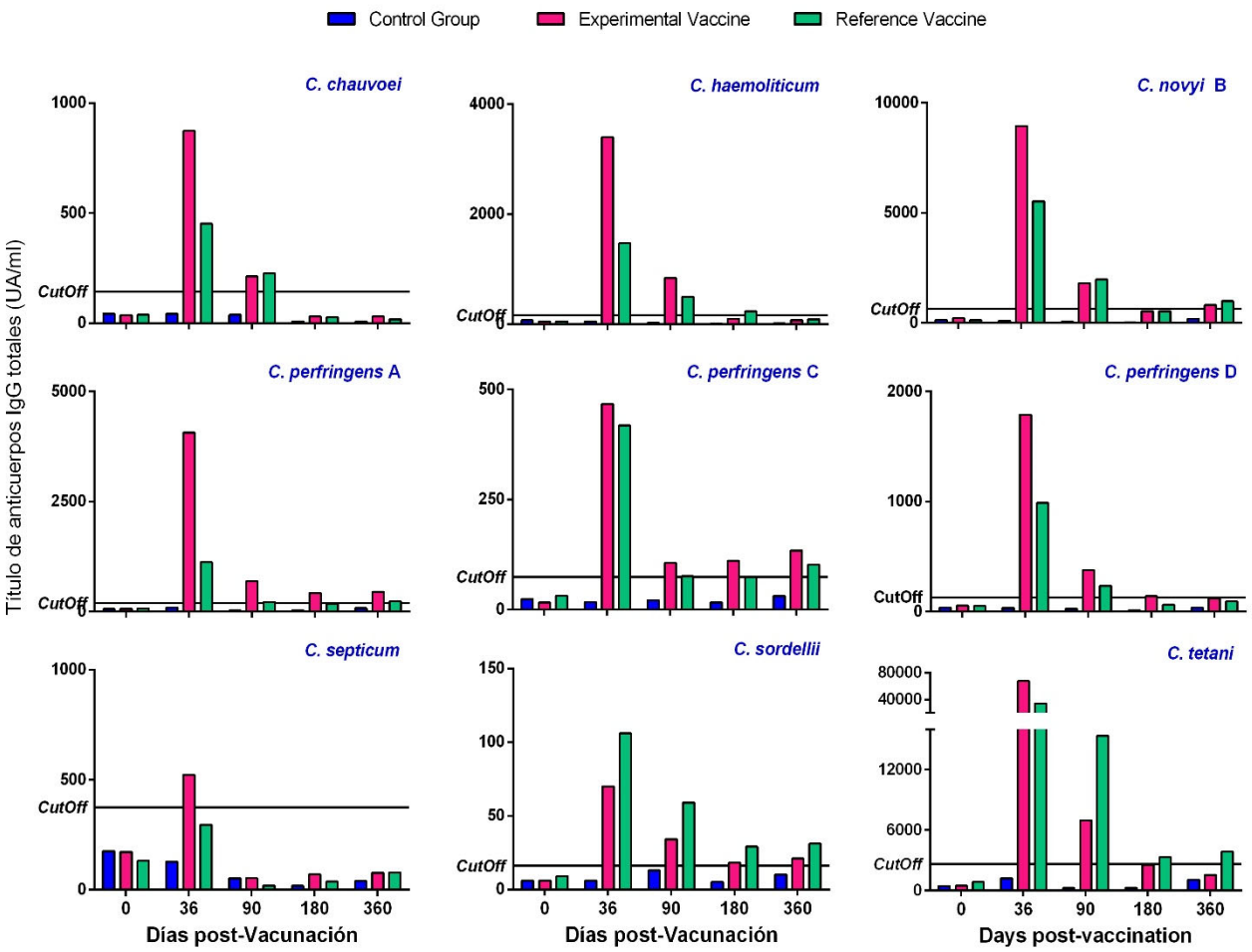

Figura 3-24. Evolución temporal de los niveles de IgG contra *Clostridium* spp. en ovinos de los grupos vacuna experimental, referencia o control del *Ensayo A*. Los niveles de anticuerpos fueron evaluados a los días 0, 36, 90, 180 y 360 dpv en pooles de sueros: grupo control n = 5 (barras azules); grupo vacuna experimental n = 10 (barras rosadas), o grupo de vacuna de referencia n = 10 (barras verdes). En cada gráfico fue trazada la línea de "*cut-off*" calculada para el antígeno.

dpv son muy bajos para todas las especies de *Clostridium* independientemente de la vacuna utilizada, con valores levemente más altos que el valor de "*cut-off*" para algunos antígenos (*C. novyi* tipo B, *C. perfringens* tipo A y C, *C. sordelli* y *C. tetani*) y claramente negativos para otros (*C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. perfringens* tipo D y *C. septicum*).

II │Ensayo en bovinos

La respuesta humoral en bovinos, después de las dos inmunizaciones con las vacunas experimental o de referencia, fue marcadamente más débil que la observada en los ovinos. Sin embargo, al igual que en las ovejas, también se caracterizó por una gran variación intergrupal (Fig. 3-25).

En los bovinos vacunados con la vacuna de referencia fue inducida una respuesta específica contra todas las valencias en algunos animales del grupo, sin embargo, sólo contra los antígenos de *C. novyi* tipo B y *C. perfringens* tipo D, se observó que todos los animales del grupo montaron una respuesta positiva de anticuerpos. En cambio, la inmunización con la vacuna experimental indujo respuesta de anticuerpos muy débil y solo para *C. perfringens* tipo C se observó que 6 de 10 animales superaron el valor de "*cut-off*". Para el resto de las valencias, la mayoría de los animales no se seroconvirtieron (Fig. 3-25).

Dentro del grupo Control, uno de los animales (bovino #1) mostró niveles de anticuerpos específicos contra la mayoría de las valencias (*C. haemolyticum*, *C. perfringens* tipo A, C y D, *C. sordelli* y *C. tetani*) (Fig. 3-25).

Al día 90 post vacunación, el título de anticuerpos contra todas las especies de *Clostridium* incluidas en las vacunas, fueron mayores que al día 36 dpv. Este aumento también fue observado en los animales testigos (grupo Control) lo que nos sugirió que estos bovinos seguramente hayan estado expuestos a alguna/s especies de *Clostridium* (resultados no incluidos en la tesis). Dados los resultados obtenidos en el día 90 dpv, no se continuó evaluando la evolución de la respuesta humoral a lo largo de un año.

3.2.1.1.2 │Análisis de la respuesta celular

Nuestro objetivo fue estudiar si la vacunación indujo una respuesta celular específica, para ello fue analizado el perfil de expresión génica de citoquinas en muestras de sangre estimuladas con antígenos clostridiales de importancia epidemiológica en nuestro país (*C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo B y *C. septicum*). En este modelo, se utilizó la estrategia experimental del modelo de aftosa, sin embargo debieron ser optimizadas las concentraciones de estimulación de los tres antígenos clostridiales, para ello se probaron dos concentraciones 10 y 15 μg/ml, y se seleccionó la concentración más alta para estimular. Además, debieron ser optimizadas las

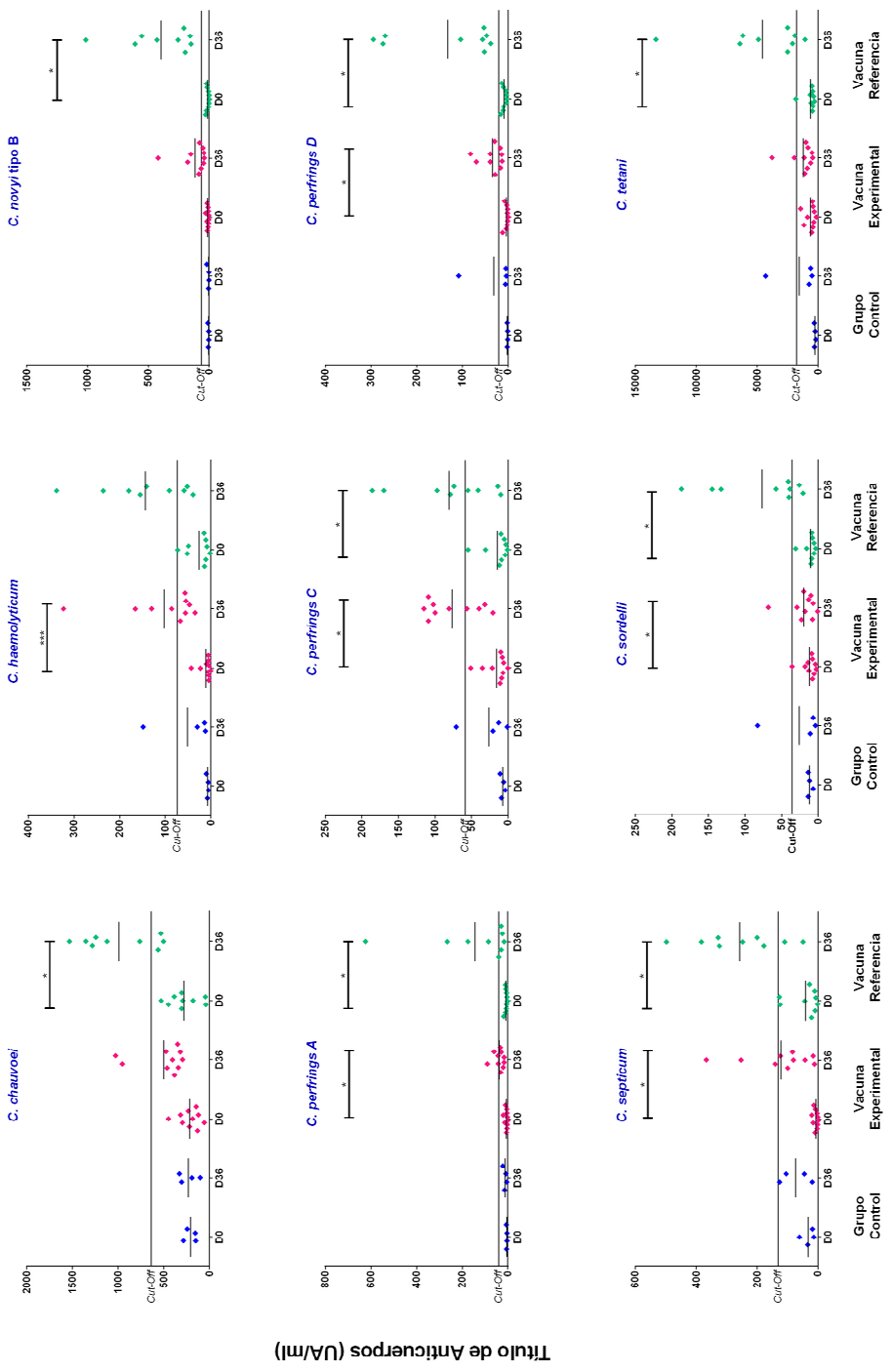

Figura 3-25. Título de anticuerpos IgG totales contra antígenos de *Clostridium* en sueros de bovinos inmunizados con vacuna experimental, de referencia o sin tratamiento (grupo control) del *Ensayo A*. Los resultados muestran las medias de los niveles de IgG a 0 y 36 dpv. Cada punto representa un animal, siendo los puntos azules el grupo control, los rosados los que recibieron la vacuna experimental y los verdes la vacuna de referencia. Las diferencias significativas en las respuestas, dentro de un mismo grupo o entre grupos a diferentes tiempos post-vacunación son marcadas con asteriscos. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns * p <0.05; ** p <0,01

RT-qPCR para cuantificar las siguientes citoquinas ovinas IFN-γ, IL-4, IL-12B (p40), TNF-α, IL-1β, IL-10 e IL-17. Los primers fueron tomados de la bibliografía y su especificidad fue verificada como se detalla en la Sección 2.4.3 (M&M). Las secuencias y el tamaño de los amplicones se detallan en el Anexo 1. El gen GAPDH fue elegido como gen de expresión constitutiva para la cuantificación relativa.

Una vez optimizados ambos puntos, se analizaron las muestras de sangre de este ensayo del cual seleccionamos al azar 5 animales de cada grupo vacunado (Vacuna Experimental o

Referencia) y los 5 animales del grupo control (Fig. 3-20). Cada muestra de sangre fue estimulada de acuerdo a como se detalla en la Sección 2.3.2 (M&M) con antígenos clostridiales. Además, las muestras de sangre fueron estimuladas con ConA y PBS como controles positivo y negativo.

Para la cuantificación relativa fueron utilizados el gen de GAPDH o β2M como gen housekeeping de ovinos y bovinos, respectivamente. La condición control para relativizar fue el promedio de los niveles de los animales sin vacunar estimulados con PBS al día 0 dpv. Cabe destacar que no fue posible analizar la expresión génica de citoquinas en respuesta a los antígenos clostridiales al inicio del ensayo (0 dpv), debido a que al inicio del ensayo aún no se contaba con los antígenos clostridiales para estimular. Por ello, la respuesta a los antígenos fue comparada con la de los animales del grupo control a los 36 dpv.

I │Ensayo en Ovinos

Se evaluó la expresión de los ARNm de las citoquinas IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-10, IL-12B e IL-17, y el resultado mostró que sólo se indujo expresión del ARNm de IFN-γ en animales vacunados.

La estimulación policlonal con ConA indujo un aumento en el nivel expresión de IFN-γ en los animales vacunados con la vacuna experimental. Este aumento en la expresión fue significativamente mayor a los niveles de expresión de las ovejas del grupo control (previo y posterior a la vacunación) o las del grupo vacuna de referencia (Fig. 3-26A). El análisis de la respuesta específicas contra los antígenos mostró que la estimulación con *C. chauvoei* y *C. septicum* indujo la expresión de IFN-γ en el grupo que recibió la vacuna experimental. La respuesta contra ambos antígenos fue significativamente mayor en dicho grupo con respecto al grupo control y al de vacuna de referencia. *C. perfringens* D estimuló levemente la expresión del ARNm de IFN-γ en el grupo vacuna experimental expresaron con respecto a los otros dos grupos, sin embargo las diferencias no fueron significativas (Fig. 3-26B).

II│ Ensayo en bovinos

Para evaluar el perfil de los linfocitos circulantes inducidos por la vacunación contra las enfermedades clostridiales, fueron cuantificadas las expresiones génicas de IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17, TNF-α, TGF-β, IL-1α e IL-12B. Al igual que en ovinos, la estimulación policlonal y los antígenos específicos indujeron la expresión del IFN-γ en los bovinos vacunados. Frente a la estimulación policlonal vimos la inducción de la expresión del ARNm de esta citoquina en el grupo de bovinos que recibió la vacuna experimental, el cual mostró diferencias significativas con respecto a los grupos vacuna experimental y control (Fig. 3-27A).

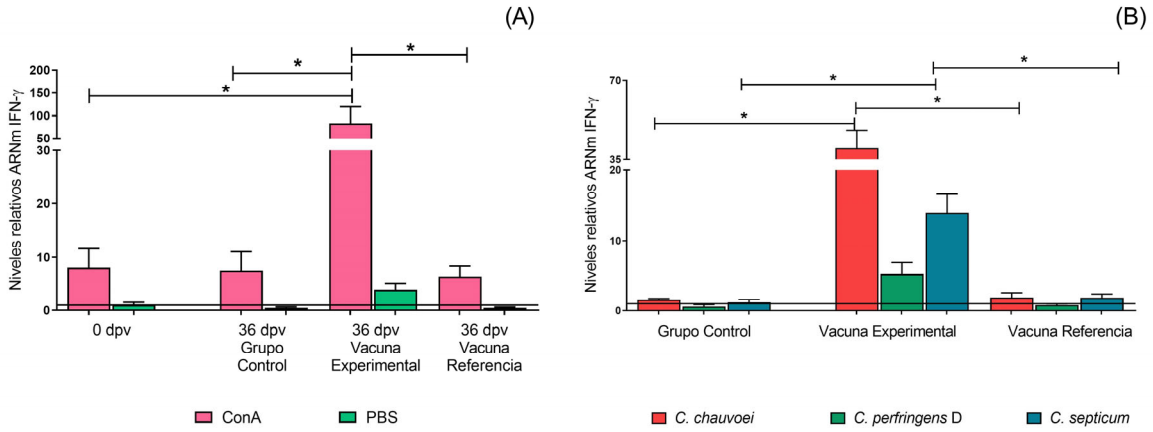

Figura 3-26. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en ovinos vacunados con vacuna policlostridial experimental y de referencia, y en ovinos naïve del *Ensayo A*. En (A) se muestran los niveles de ARNm de IFN-γ fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con ConA (barras rosadas) o PBS (barras verdes) a los días 0 y 36 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo en respuesta al ConA y al PBS en vacunados (n=5, en ambos grupos), y control (n=5). En (B) se muestran los niveles de ARNm de IFN-γ fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígenos de *C. chauvoei* (barras rojas), *C. perfringens* D (barras celestes), o *C. septicum* (barras verdes) a los 36 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo en respuesta a cada antígeno en animales vacunados (n=5, en ambos grupos), y control (n=5). Para las muestras de ambos gráficos, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. En ambos gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los ovinos del grupo control al 0 dpv. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0,05).

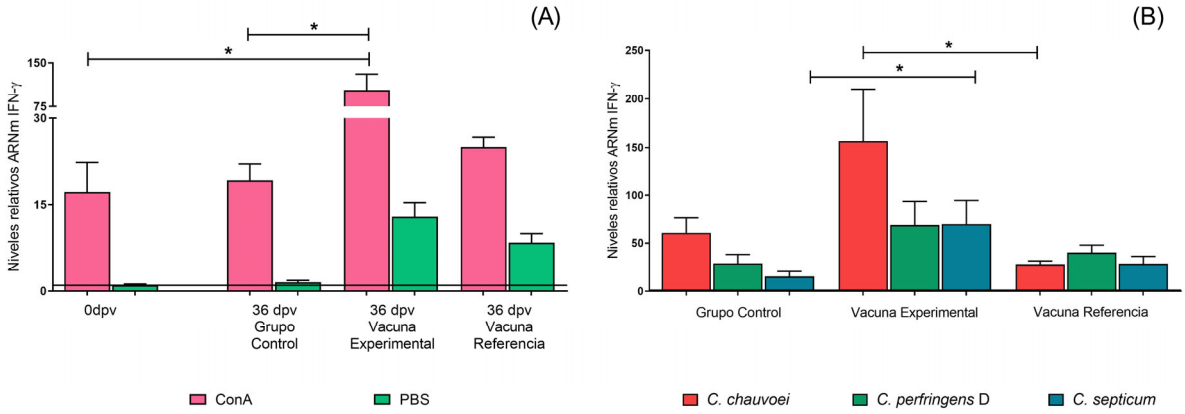

Figura 3-27. Niveles relativos del ARNm de IFN-γ en bovinos vacunados con vacuna policlostridial experimental y de referencia, y en ovinos naïve del *Ensayo A*. En (A) se muestran los niveles de ARNm de IFN-γ fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con ConA (barras rosadas) o PBS (barras verdes) a los días 0 y 36 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo en respuesta al ConA y al PBS en vacunados (n=5, en ambos grupos), y control (n=5). En (B) se muestran los niveles de ARNm de IFN-γ fueron determinados en sangre entera de cada animal, estimulada con antígenos de *C. chauvoei* (barras rojas), *C. perfringens* D (barras celestes), o *C. septicum* (barras verdes) a los 36 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo en respuesta a cada antígeno en animales vacunados (n=5, en ambos grupos), y control (n=5). Para las muestras de ambos, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. En ambos gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los ovinos del grupo control al 0 dpv. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0,05).

El antígeno de *C. chauvoei* indujo un aumento en la expresión del ARNm de IFN-γ en los animales que recibieron la vacuna experimental, observándose una diferencia significativa contra el grupo de bovinos que recibieron la vacuna de referencia. Por otra parte, el antígeno de *C. septicum* también estimuló la expresión del ARNm de IFN-γ en el grupo vacuna experimental. Sin embargo, a diferencia de *C. chauvoei* con este antígeno sólo se observó diferencia significativa con el grupo control (Fig. 3-27B).

3.2.1.1.3 │Análisis de los resultados del "*Ensayo A*"

En suma, nuestros resultados en el contexto del "*Ensayo A*" mostraron que las vacunas policlostridiales inducen una respuesta humoral específica contra todas las valencias con una gran variación interindividual. En ovinos, los niveles de anticuerpos disminuyeron notablemente luego del día 90, siendo prácticamente indetectables en algunos animales al año, sugiriéndonos que si bien, la revacunación anual es eficaz controlando la enfermedad clostridial, los anticuerpos no serían el único correlato de protección. En función de esto, nos embarcamos a estudiar la respuesta celular, enfocándonos en analizar los perfiles de expresión génica de citoquinas, luego de dos dosis vacunales. Los linfocitos circulantes, de ovinos y bovinos que recibieron la vacuna experimental, expresaron niveles mayores del ARNm de IFN-γ que los animales control y los que recibieron la vacuna de referencia en respuesta a la estimulación antígeno específica (en particular con *C. chauvoei* y *C. septicum*). Una fotografía similar fue observada frente a la estimulación policlonal con ConA. En función de esto, nuestros resultados nos sugieren que la vacunación de ovinos y bovinos indujo una respuesta celular temprana tipo Th1.

Los resultados obtenidos en ovinos fueron publicados en el artículo "Temporal evolution of anti-*Clostridium* antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccine" en la revista Veterinary Immunology and Immunopathology en el año 2018. El artículo se adjunta en el Anexo 4.

3.2.1.2 │Ensayo B

En ensayo realizado en bovinos por la empresa colaboradora con la finalidad de evaluar la eficacia contra *C. chauvoei* inducida por la misma vacuna policlostridial 9 valente utilizada en el "*Ensayo A*". Ocho bovinos recibieron dos dosis de vacuna, a los 0 y 42 días. En el ensayo fueron incluidos 3 animales centinela, sin vacunar, que denominamos animales control. Los animales fueron sangrados regularmente por personal de la empresa, y la sangre fue procesada en nuestro laboratorio para analizar la respuesta humoral y celular contra *C. chauvoei* (Fig. 3-28 y Sección 2.1.2 de M&M). Los bovinos vacunados y control de este ensayo fueron desafiados a los 69 dpv con *C. chauvoei* pero estos resultados frente al desafío son

mostrados en la Sección 3.2.2. En este Ítem de la tesis solo mostramos los resultados obtenidos en respuesta a la vacunación.

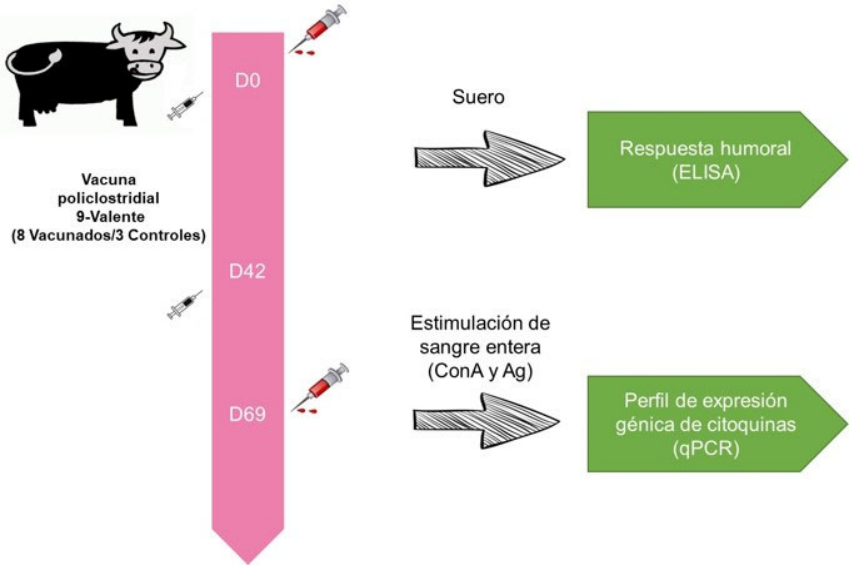

Figura 3-28. Esquema de *Ensayo B* en bovinos. Los animales fueron divididos aleatoriamente en: grupo Vacunado (n=8) y grupo Control (n=3). La vacuna fue administrada en dos dosis a los días 0 y 42. Los animales fueron sangrados a los días 0 y 69 post-vacunación (dpv) para analizar la respuesta celular y humoral.

3.2.1.2.1 │Análisis de la respuesta humoral

Para evaluar los niveles de anticuerpos contra *C. chauvoei* fue utilizado el ELISA específico y el valor de "*cut-off*" determinado para el "*Ensayo A*". Los resultados mostraron que los bovinos vacunados indujeron una respuesta específica contra *C. chauvoei* significativamente mayor que la montada por el grupo control (Fig. 3-29). Tal como se reportó en el "*Ensayo A*", la respuesta presentó una gran variabilidad intergrupal, sin embargo, el porcentaje de animales que indujeron una respuesta fue mayor en el "*Ensayo B*" (5 de 8 bovinos) que en el "*Ensayo A*" (2 de 10 bovinos) (Fig. 3-25). No fueron evaluadas las respuestas contra las otras valencias dado que el ensayo estuvo enfocado en la respuestas específicas contra *C. chauvoei*.

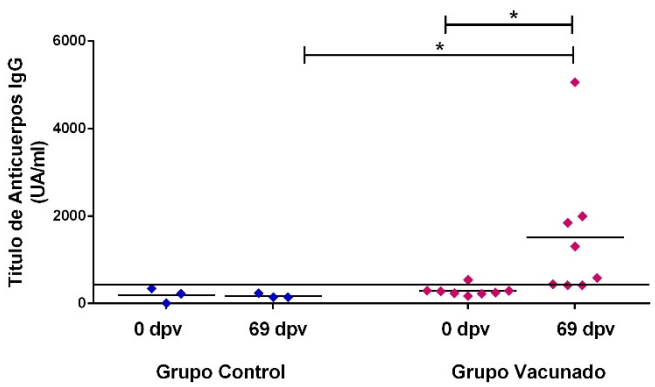

Figura 3-29. Título de anticuerpos IgG totales contra *C chauvoei* en sueros de bovinos del *Ensayo* B inmunizados con vacuna policlostridial o sin tratamiento (grupo control). Los resultados muestran las medias de los niveles de IgG a 0 y 69 dpv. Cada punto representa un animal, siendo los puntos azules el grupo control, los rosados los vacunados. Las diferencias significativas en las respuestas, dentro de un mismo grupo o entre grupos a diferentes tiempos post-vacunación son marcadas con asteriscos. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns * p <0.05

3.2.1.2.2 │Análisis de la respuesta celular

Para evaluar el perfil de los linfocitos circulantes inducido por la vacunación policlostridial, fueron cuantificadas las expresiones génicas de las mismas citoquinas que en el "*Ensayo A*". Los resultados mostraron que en los bovinos vacunados inducen la expresión de los ARNm de IL-17 e TGF-β frente a la estimulación con ConA, con respecto a ellos mismos previo a la vacunación (Fig. 3-30). La expresión de las citoquinas IFN-γ, IL-4 y TNF-α mostró una tendencia al aumento producto de la vacunación, aunque las diferencias no fueron significativas. Para todas las citoquinas, excepto para TGF-β, se observó al 0 dpv una tendencia a la represión en el grupo que recibió la vacuna (Fig. 3-30). El análisis de la respuesta específica mostró que el antígeno de *C. chauvoei* indujo la expresión de los ARNm IFN-γ, IL-17, TNF-α y TGF-β en los bovinos vacunados luego de las dos dosis administradas (Fig. 3-31).

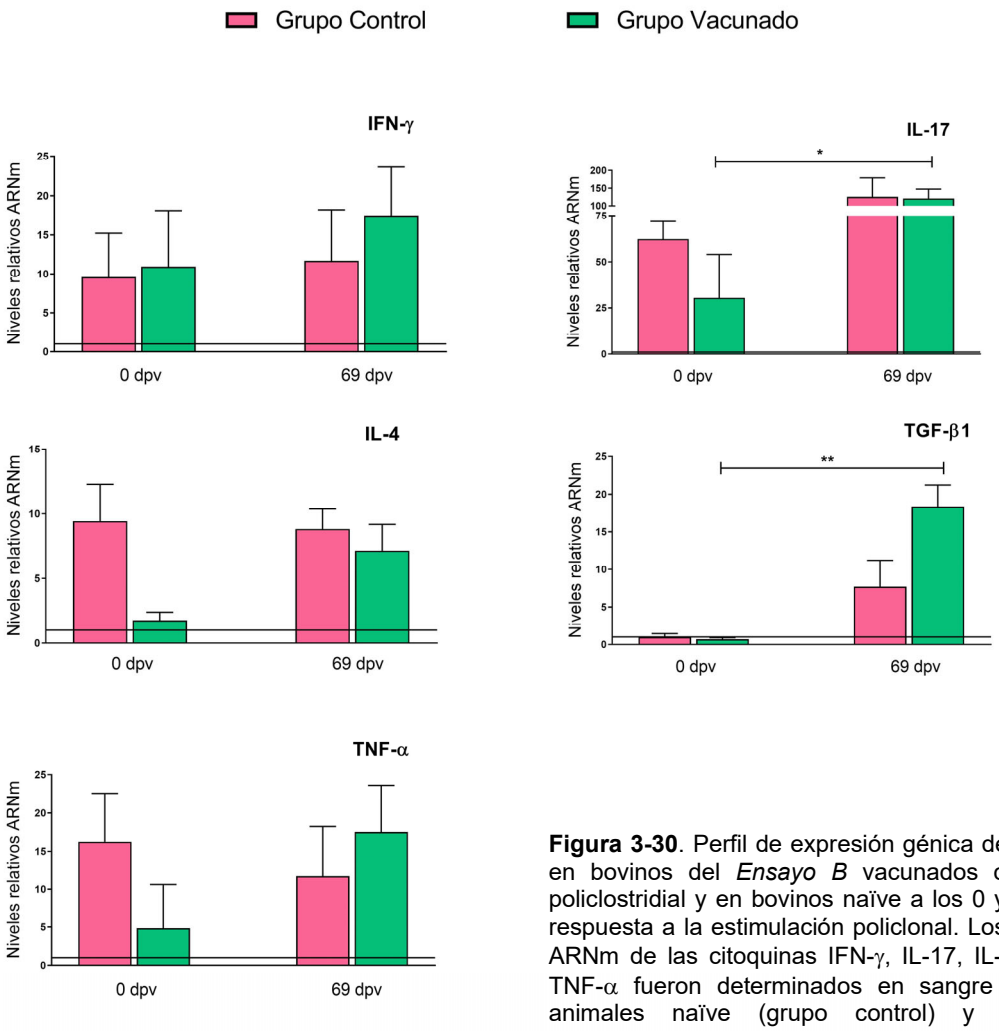

Figura 3-30. Perfil de expresión génica de citoquinas en bovinos del *Ensayo B* vacunados con vacuna policlostridial y en bovinos naïve a los 0 y 69 dpv en respuesta a la estimulación policlonal. Los niveles de ARNm de las citoquinas IFN-γ, IL-17, IL-4, TGF-β y TNF-α fueron determinados en sangre entera, de animales naïve (grupo control) y vacunados, estimulada con ConA o PBS. Para cada muestra, los niveles de ARNm de cada citoquina fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como el nivel relativo al comparar con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo, en respuesta al ConA, en el grupo control (barras rosadas) y en el grupo vacunado (barras verdes). En todos los gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de cada citoquina de las muestras de sangre de los bovinos del grupo control al 0 dpv. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0.05; **p < 0.01).

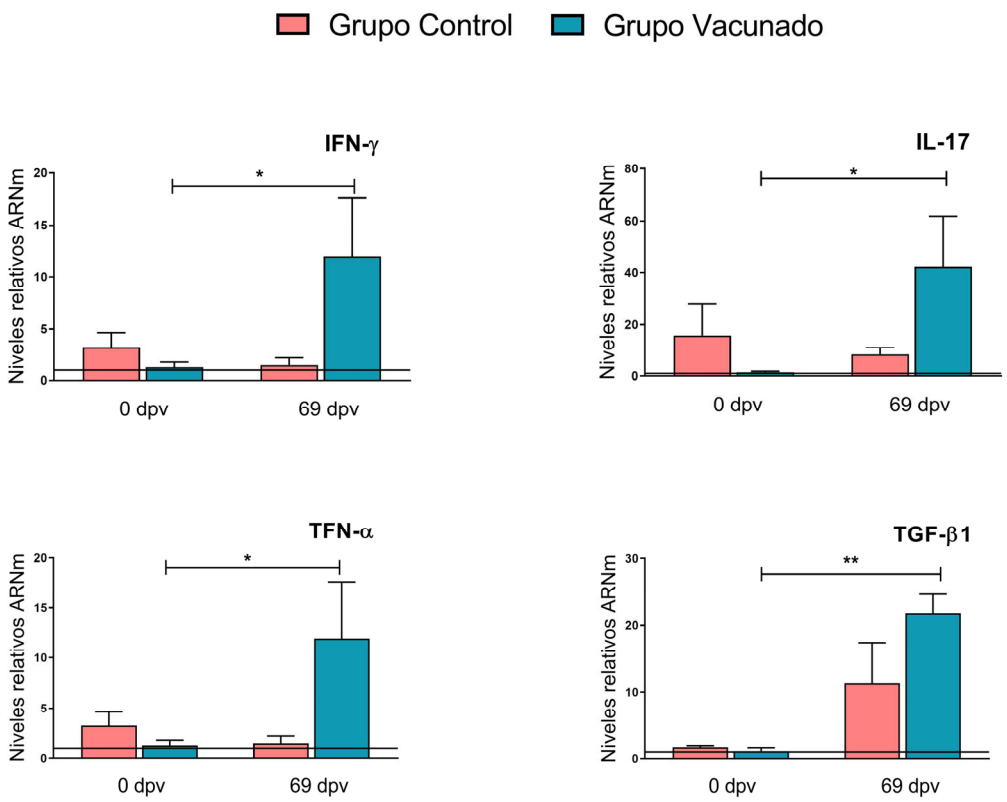

Figura 3-31. Perfil de expresión génica de citoquinas en bovinos del *Ensayo B* vacunados con vacuna policlostridial y en bovinos naïve a los 0 y 69 dpv en respuesta a la estimulación específica con *C. chauvoei*. Los niveles de ARNm de las citoquinas IFN-γ, IL-17, TGF-β y TNF-α fueron determinados en sangre entera, de animales naïve (grupo control) y vacunados, estimulada con antígeno de *C. chauvoei*. Para cada muestra, los niveles de ARNm de cada citoquina fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como el nivel relativo al comparar con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo, en respuesta al antígeno de *C. chauvoei*, en el grupo control (barras rosadas) y en el grupo vacunado (barras azules). En todos los gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de cada citoquina de las muestras de sangre de los bovinos del grupo control al 0 dpv. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0.05; **p < 0.01).

Por otro lado, las citoquinas IL-10, IL-1α e IL-12B mostraron perfiles de expresión frente al ConA y al antígeno de *C. chauvoei* muy variables y contradictorios que no nos permiten concluir al respecto (resultados no son mostrados).

3.2.1.2.3 │Análisis de los resultados del "*Ensayo B*"

En suma, la vacunación policlostridial de bovinos induce una respuesta humoral y celular contra *C. chauvoei*. Los animales vacunados desarrollaron una respuesta de anticuerpos específicos con una importante variabilidad intergrupal, observándose que algunos de los animales desarrollaron una respuesta de anticuerpos que no superó el nivel de "*cut-off*". Además, la vacunación mostró que induce una respuesta de celular caracterizada por ser pro-inflamatoria tipo Th1 y Th17. *C. chauvoei* mostró que estimula la expresión de los ARNm IFN-γ, IL-17, TNF-α y TGF-β.

3.2.2 | ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN CONTRA *Clostridium* spp.

3.2.2.1 | Ensayo Vacunación y Desafío

Para evaluar la respuesta inmune asociada a la protección inducida por la vacuna policlostridial nos enfocamos en el ensayo de vacunación y desafío contra *C. chauvoei* ("*Ensayo B*" descrito en la secciones 2.1.2 de M&M y 3.2.1.2 de este capítulo). Como se mencionó anteriormente, la empresa colaboradora evaluó la eficacia contra este clostridio, por lo que bovinos vacunados y controles fueron desafiados contra *C. chauvoei*. El desafío fue realizado con una suspensión de esporas en forma intramuscular profunda a los 69 dpv (Sección 2.1.2 de M&M). Los animales fueron observados las 72 horas posteriores por veterinarios de la empresa. Con los datos registrados de la sintomatología clínica, temperatura y valorándose las lesiones a nivel del miembro afectado fue elaborado un score clínico. Con los datos de la Tabla 3.13 puede observarse que los animales no vacunados presentaron síntomas muy agudos y murieron dentro de las 48 y 72 h de la inoculación. Los animales vacunados presentaron sintomatología parcial, pero a diferencia de los no vacunados, evolucionaron favorablemente.

Grupo	ID. Animal	Vacunación	Descarga 8000 DL 50	Datos clínicos			
				Temperatura °C		Valoración de la lesión	
				24 h	48 h	24 h	48 h
Vacunado	1	+	+	39,9	40,5	+	+
	2	+	+	39,1	39,8	+	+
	3	+	+	39,8	39,2	-	+
	4	+	+	39,3	39,8	+	++
	5	+	+	39,6	39,8	-	-
	6	+	+	39,9	39,2	+	+
	7	+	+	39,8	39,7	+	+
	8	+	+	39,0	39,6	-	+
Control	1	-	+	39,6		+++	+++
	2	-	+	40,1		+++	+++
	3	-	+	39,3		+++	+++

Tabla 3-13. Resultados clínicos del desafío de bovinos vacunados y control con *C. chauvoei* del "*Ensayo B*". Los animales fueron dejados en observación, registrándose la sintomatología clínica, temperatura y valorándose las lesiones a nivel del miembro afectado por 72 h. La simbología en las columnas de Vacunación y Descarga son: (+): recibió y (-): no recibió. La simbología en las columnas de Datos clínicos es:
-: Sin cambios aparentes al tacto
+: Leve tumefacción
++: Tumefacción aparente, leve deformación del miembro, presencia de edema
+++: Gran tumefacción, importante deformación del miembro, calor al tacto e importante presencia de edema.

En el contexto del ensayo, nos enfocamos en evaluar como el desafío modifica las respuestas humoral y celular, con el objetivo de encontrar diferencias que nos permitan sugerir posibles correlatos de protección asociados a la vacunación. Para ello, accedimos a las muestras de sangre de estos animales previo al desafío (69 dpv) y 24 horas post-desafío (70 dpv), las cuales fueron procesadas para evaluar la respuesta de anticuerpos y la respuesta celular mediante la valoración de los perfiles de expresión de citoquinas y linfoproliferación frente al antígeno de *C. chauvoei* (Fig. 3-32).

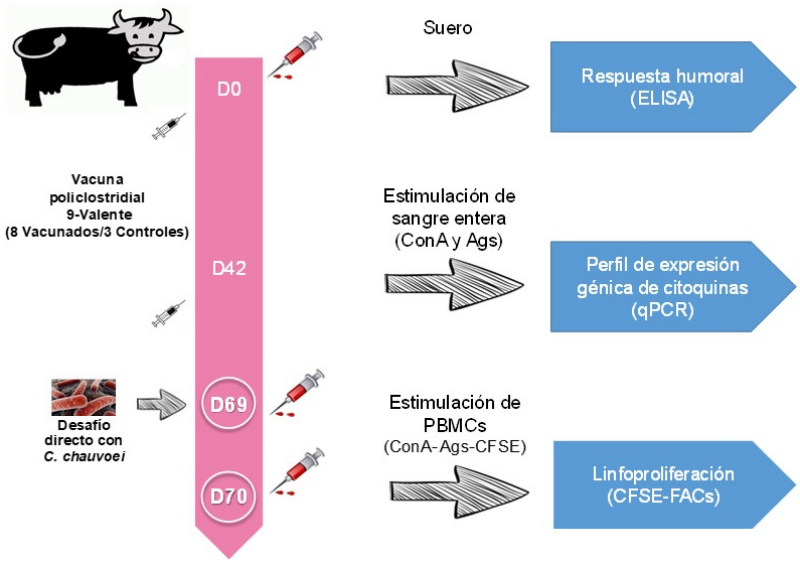

Figura 3-32. Esquema del *Ensayo B* de vacunación policlostridial y desafío contra *C. chauvoei* en bovinos. Este ensayo es parte del denominado "*Ensayo de vacunación B*" descrito en la Sección 4.1.2, en el cual los animales fueron divididos aleatoriamente en: grupo Vacunado (n=8) y grupo Control (n=3). La vacuna fue administrada en dos dosis a los 0 y 42 dpv. A los 69 dpv los bovinos vacunados y control fueron desafiados con esporas de *C. chauvoei*. Para analizar la respuesta humoral y celular asociada a la protección por la vacunación policlostridial los animales fueron sangrados previo al desafío (69 dpv) y a las 24 horas post-desafío (70 dpv), ambas fechas son destacadas en el esquema con un círculo.

3.2.2.2 | Análisis de la respuesta inmune

3.2.2.2.1 | Respuesta humoral

La respuesta humoral, evaluada utilizando el ELISA específico contra *C. chauvoei* en bovinos, mostró que los animales vacunados, al 70 dpv, mantienen niveles de anticuerpos significativamente mayores que el grupo control. No se observó una diferencia significativa pre y post-desafío en los bovinos vacunados (Fig. 3-33). Lamentablemente, los animales no fueron debidamente identificados por lo que no fue posible realizar una comparación entre el título de anticuerpos y el score clínico. Sin

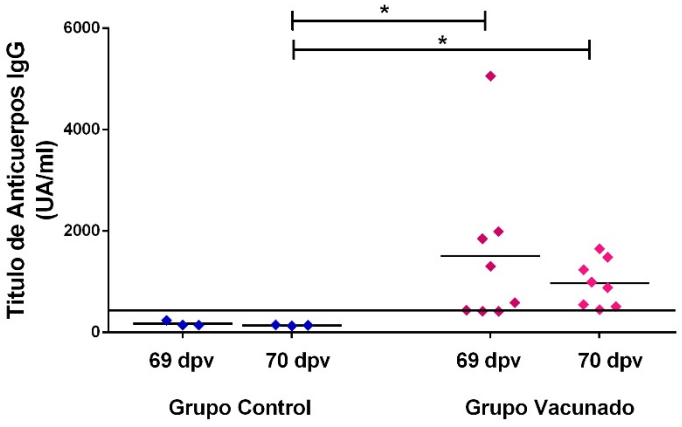

Figura 3-33. Título de IgG total contra *C chauvoei* en sueros de bovinos del *Ensayo B* vacunados o control pre y post-desafío contra *C. chauvoei* o grupo control. Los resultados muestran las medias de los niveles de IgG a 69 y 70 dpv. Cada punto representa un animal, siendo los puntos azules el grupo control, los rosados los vacunados. Las diferencias significativas en las respuestas, dentro de un mismo grupo o entre grupos a diferentes tiempos post-vacunación son marcadas con asteriscos. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns * p <0.05

embargo, observamos que más allá de la variabilidad inter-individual de la respuesta previo al desafío (69 dpv) los animales permanecieron protegidos, incluso cuando consideramos los tres que no seroconvirtieron (Fig. 3-33).

3.2.2.2.2 │Respuesta celular

I │Perfil de expresión génica de citoquinas

El perfil de expresión génica de citoquinas fue analizado en muestras de sangre frente a la estimulación policlonal con ConA y antigénica con *C. chauvoei*. Los resultados mostraron que el desafío indujo una inhibición de la expresión de los ARNm de las citoquinas analizadas, con respecto a los niveles mostrados por esos mismos animales, previo al desafío.

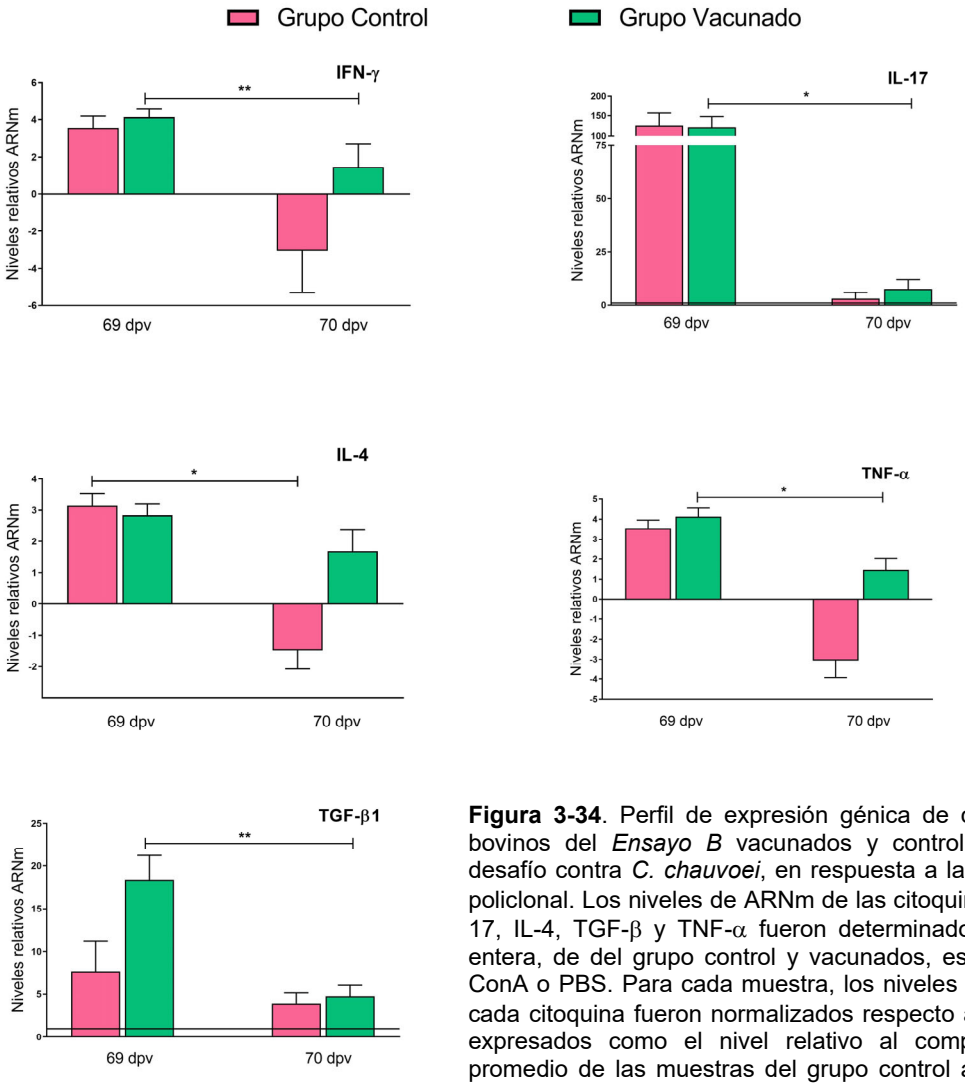

Figura 3-34. Perfil de expresión génica de citoquinas en bovinos del *Ensayo B* vacunados y control pre y post-desafío contra *C. chauvoei*, en respuesta a la estimulación policlonal. Los niveles de ARNm de las citoquinas IFN-γ, IL-17, IL-4, TGF-β y TNF-α fueron determinados en sangre entera, de del grupo control y vacunados, estimulada con ConA o PBS. Para cada muestra, los niveles de ARNm de cada citoquina fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como el nivel relativo al comparar con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo en respuesta al ConA, en el grupo control (barras rosadas) y en el grupo vacunado (barras verdes). En todos los gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de cada citoquina de las muestras de sangre de los bovinos del grupo control al 0 dpv. Para las citoquinas IFN-γ, IL-4 y TNF-α los resultados están expresados en escala logarítmica. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0.05; **p < 0.01).

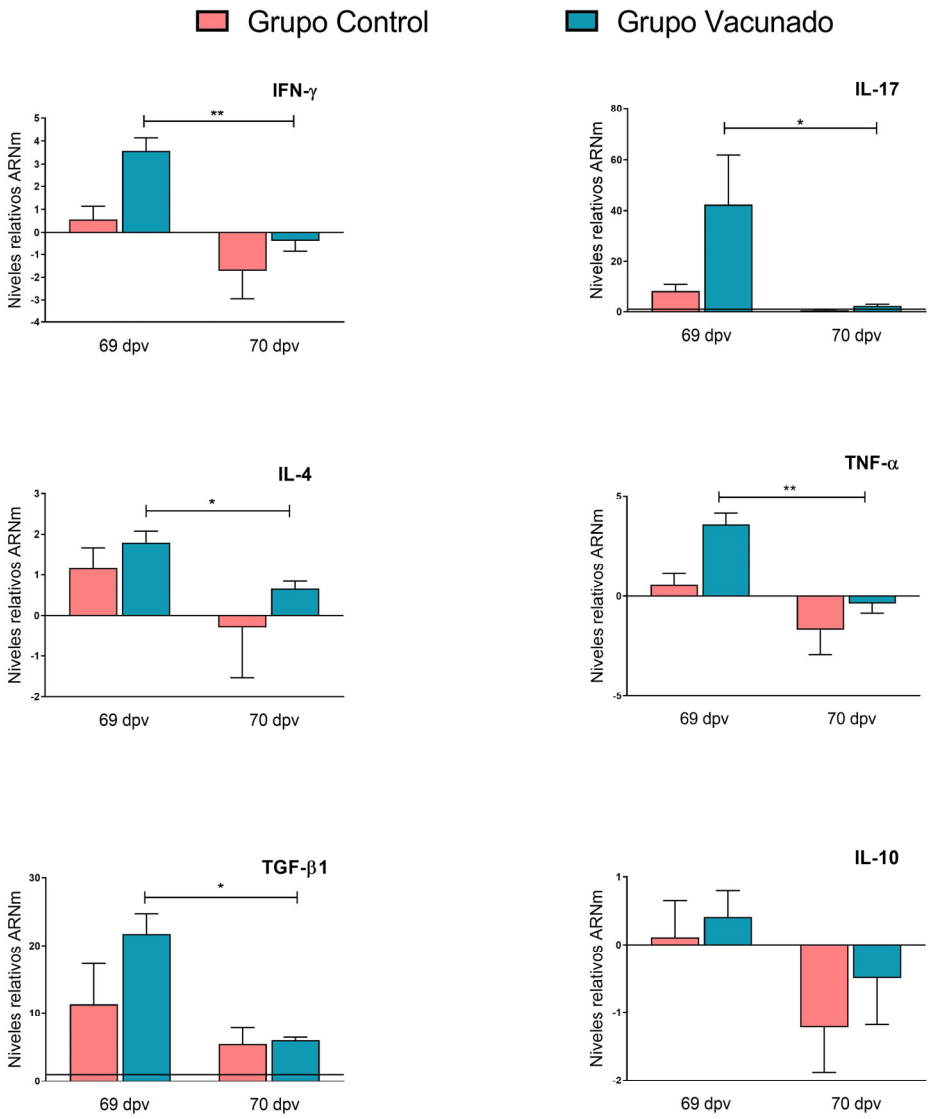

Figura 3-35. Perfil de expresión génica de citoquinas en bovinos del *Ensayo B* vacunados y control pre y post-desafío contra *C. chauvoei*, en respuesta a la estimulación específica con *C. chauvoei*. Los niveles de ARNm de las citoquinas IFN-γ, IL-17, IL-4, IL-12B, TGF-β1, TNF-α e IL-10 fueron determinados en sangre entera, de animales del grupo control y vacunados, estimulada con antígeno de *C. chauvoei*. Para cada muestra, los niveles de ARNm de cada citoquina fueron normalizados respecto al gen β2M y expresados como el nivel relativo al comparar con el promedio de las muestras del grupo control al 0 dpv. Los resultados indican la media y el SEM del nivel relativo, en respuesta al antígeno de *C. chauvoei*, en el grupo control (barras rosadas) y en el grupo vacunado (barras verdes). En todos los gráficos la línea trazada (y=1) corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de cada citoquina de las muestras de sangre de los bovinos del grupo control al 0 dpv. Para las citoquinas IFN-γ, IL-4, TNF-α e IL-10 los resultados están expresados en escala logarítmica. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (*p < 0.05; **p < 0.01).

La inhibición de la expresión asociada al desafío, fue observada para los ARNm de IFN-γ, IL-17, TGF-β1 y TNF-α tanto frente a la estimulación con ConA (Fig. 3-34) como a la estimulación con el antígeno de *C. chauvoei* (Fig. 3-35).

Por su parte la expresión de IL-4, se mostró inhibida significativamente, a las 24 h del desafío, en el grupo control (frente al ConA) y en el grupo vacunado (frente al antígeno). El ARNm de IL-10, mostró una tendencia a la inhibición en respuesta al antígeno de *C. chauvoei* en los bovinos vacunados luego del desafío, sin embargo, las diferencias con respecto al pre-desafío

no fueron significativas. Cabe destacar, que la inhibición de la expresión de las citoquinas fue observada tanto en bovinos vacunados como control. Sin embargo, las diferencias significativas surgieron casi exclusivamente (con excepción de IL-4), cuando se comparan los vacunados pre y post-desafiados.

II │Linfoproliferación celular

Dentro de esta actividad, nos planteamos evaluar, en los bovinos pre y post-desafiados, que poblaciones eran capaces de proliferar diferencialmente en respuesta al antígeno específico. Para ello, fueron purificados los PBMC de cada uno de los animales vacunados y control, y marcados con CFSE de modo de poder seguir la proliferación por citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con ConA (control positivo), antígeno de *C. chauvoei*, y PBS (control negativo). Finalizada la estimulación, las células fueron marcadas con anticuerpos para detectar las principales poblaciones celulares linfocitarias (linfocitos T $CD4^+$, T $CD8^+$ y linfocitos B). El panel de anticuerpos utilizado fue: CD4_PE (células T $CD4^+$), CD8_Alexa 647 (células T $CD8^+$) y CD22_biot_PECy7 (células B) (*AbD Serotec*).

A modo de ejemplo en la figura 3-36 se muestra la marcación de CFSE de PBMC de un animal vacunado y estimulado con ConA, destacándose los picos de fluorescencia correspondientes a cada generación. La estrategia de "*gates*" utilizada para determinar cada una de las poblaciones fue definir la población linfocitaria (P1) en un gate en el dot-plot de SSC (del inglés: *Side Scatter*) vs FSC (del inglés: *Forward Scatter*). Posteriormente, en un gráfico de densidad de altura (FSC-H) vs área (FSC-A) fueron eliminados los dobletes (P2), sobre la cual fueron definidos los $CD8^+$ y los $CD22^+$. Los $CD4^+$ fueron definidos como la población no $CD8^+$ debido a que la marcación con el anticuerpo CD4_PE no nos funcionó. Para desarrollar este objetivo se contó con la colaboración de la Dra. María Moreno.

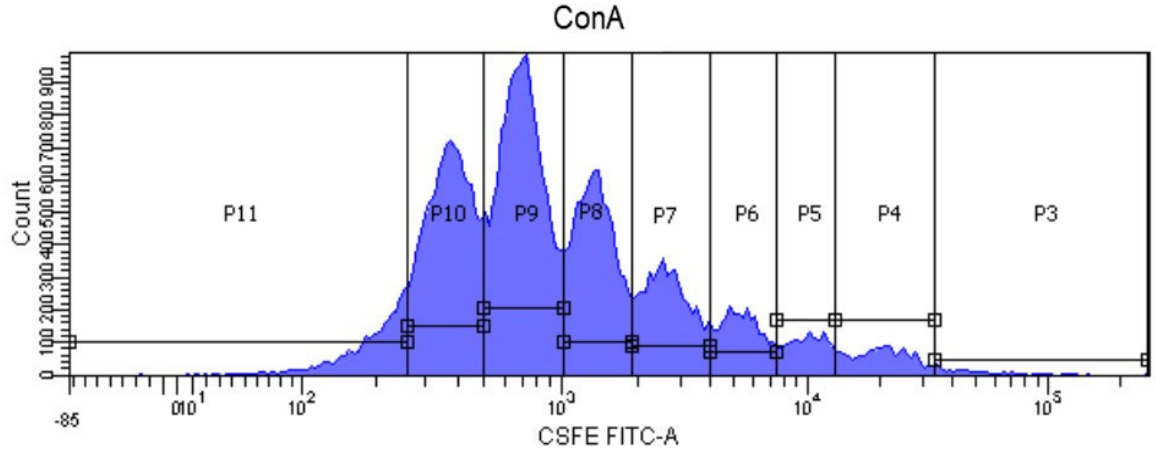

Figura 3.36. Proliferación de linfocitos T CD4+ analizados con CFSE. PBMC, purificados de un animal del *Ensayo B*, fueron teñidos con 3 μM de CFSE y estimulados con ConA por 4 días. Finalizado el cultivo las células fueron marcadas con el anticuerpo CD4_PE.

Al inicio del ensayo, nos propusimos utilizar el marcador de viabilidad 7AAD (del inglés: *7-Aminoactinomycin D*) para definir el porcentaje de linfocitos viables a partir del cual se calcularía el P.I. (del inglés: *Proliferation Index*) luego de la estimulación. Sin embargo, el número de muestras era grande por lo que el procesamiento requirió un tiempo mayor al estimado inicialmente, y por ello, fijamos las muestras y realizamos la citometría de flujo al día siguiente. Al fijar las células no fue posible definir el porcentaje de células viables con 7ADD.

La proliferación específica contra *C. chauvoei* no fue posible analizarla, debido a que nos encontramos que una vez finalizada la estimulación específica la gran mayoría de los PBMCs estaban muertos. Estos PBMCs mostraron un comportamiento diferente en el dot-plot (SSC *vs* FSC), observándose un corrimiento de los eventos adquiridos con respecto a los controles positivo (ConA) y negativo (PBS) (Fig. 3-37). En consecuencia, los eventos dentro de la población P1 fueron muy pocos y no fueron suficientes para ser analizados. Esto nos sugirió que los PBMC no estaban viables, aunque no pudimos confirmarlo dado que las muestras habían sido fijadas y por ende no pudimos utilizar la sonda 7AAD para determinar la viabilidad celular.

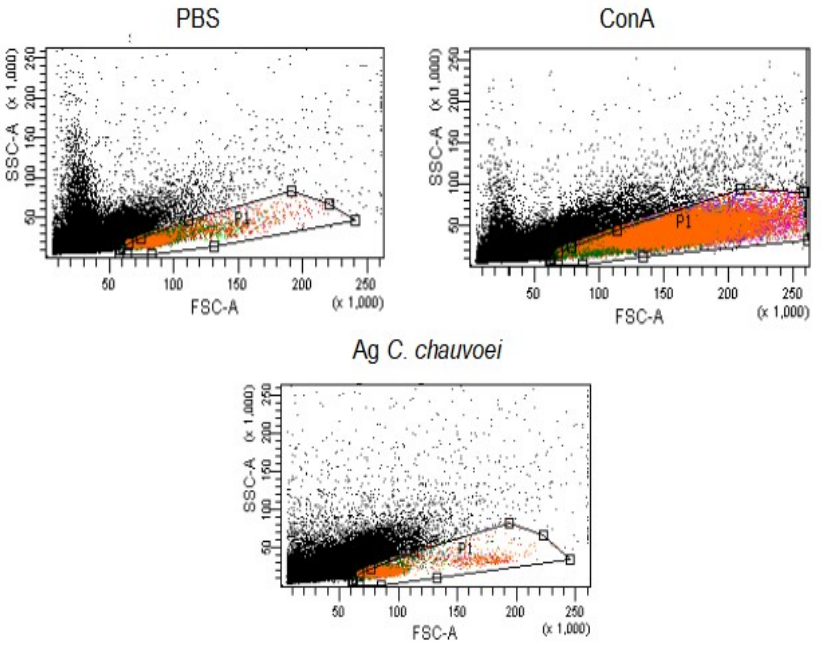

Figura 3-37. PBMC y los linfocitos totales de un bovino frente a la estimulación con PBS, ConA y antígeno de *C. chauvoei*. Los linfocitos fueron determinados colocando un "*gate*" en la muestra estimulada con ConA y delimita la población P1

En función de esto, nos focalizamos en el análisis de la proliferación frente a la estimulación policlonal con ConA. En concordancia con lo reportado cuando se analizó el perfil de expresión de citoquinas, el desafío induce una inhibición de la proliferación de las células T $CD4^+$ y T $CD8^+$. Las diferencias entre pre y post-desafío solo fueron observadas en los animales vacunados. Los bovinos del grupo control mostraron un comportamiento similar al de los animales vacunados, pero no fue posible obtener conclusiones debido al pequeño número de animales que integran el grupo (Fig. 3-38). La proliferación de las células B no mostró modificarse frente al desafío en ninguno de los grupos de animales desafiados.

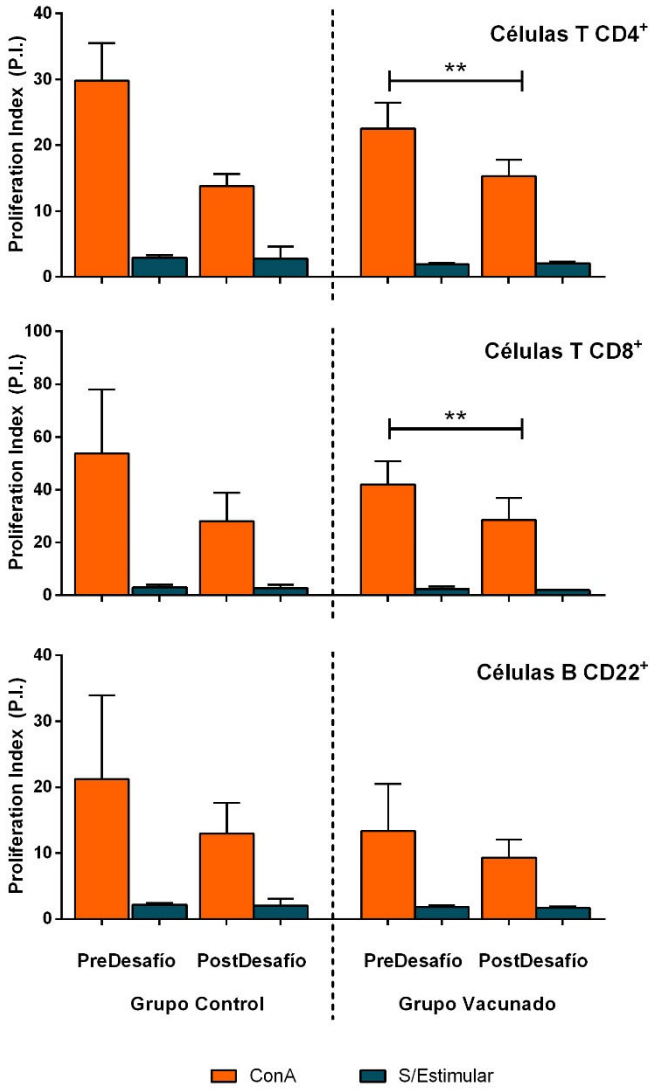

Figura 3-38. Linfoproliferación de PBMC de bovinos del *Ensayo B* vacunados y control pre y post-desafío. Los PBMC de cada animal fueron marcados con CFSE y estimulados con ConA (barras naranjas) y PBS (barras verdes), posteriormente fueron marcados para cuantificar las poblaciones de linfocitos T CD4$^+$, T CD8$^+$ y B por FACS. El índice de proliferación (PI) fue calculado para las tres poblaciones a pre (69 dpv) y post-desafío (70 dpv). Los resultados muestran las medias y SEM para los grupos vacunados (n=5) y control (n=3) en respuesta al ConA. Test de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunns (**p < 0.01).

Para descartar que los resultados de la inhibición de la proliferación fueran debido a diferencias en el porcentaje de células pre y post-desafío, fue realizada una fenotipificación de las poblaciones más importantes, para luego comparar los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T CD4$^+$, T CD8$^+$ y B en los controles sin estimular. En la figura 3-39 se observa que no hay diferencias significativas en el número de células circulante ni en los porcentajes de poblaciones de linfocitos T y B pre y post-desafío.

3.2.2.2.2 Análisis de los resultados frente al desafío del "*Ensayo B*"

En suma, nuestros resultados nos sugieren que si bien los animales vacunados fueron protegidos contra *C. chauvoei* y montaron una respuesta humoral y celular específica, el posterior desafío indujo una atenuación de la respuesta celular. A las 24 h de la inoculación de las esporas de *C. chauvoei*, la expresión de ARNm de citoquinas y de la proliferación de los

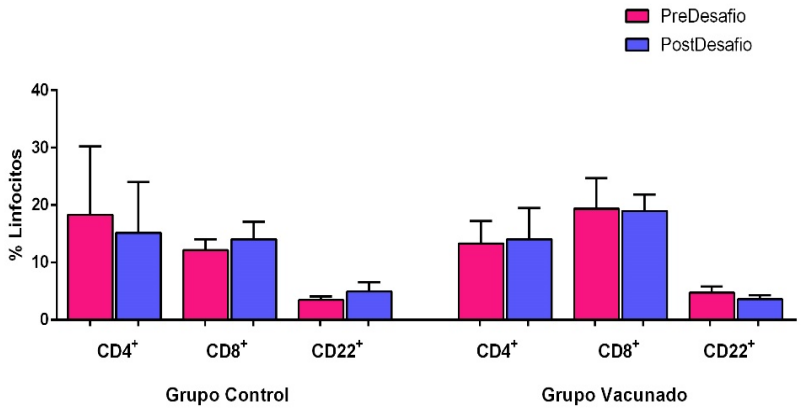

Figura 3-39. Porcentaje de linfocitos T y B en animales del *Ensayo B* vacunados y control pre y post-desafío. Los porcentajes de cada población corresponden a las poblaciones con alta expresión de CD4_PE (células T CD4$^+$), CD8_Alexa 647 (células T CD8$^+$) y CD22_biot_PECy7 (células B). Los resultados representan la media y el SEM de cada población, pre y post-desafío, en el grupo vacunado (n=5) y control (n=3) en respuesta al PBS. Test Kruskal-Wallis y Dunn.

linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$, ambas en respuesta a la estimulación policlonal, sufrieron una inhibición producto del desafío. Las grandes poblaciones y las proporciones entre ellas no variaron frente al desafío, por lo que la menor proliferación no fue causada por cambios a nivel de las poblaciones celulares. La respuesta humoral tampoco mostró una variación significativa luego del desafío. En suma, la atenuación de respuesta inmune nos sugiere la presencia de células con un perfil regulatorio o tolerogénico, cuya naturaleza resta por definir.

3.2.3 | DISCUSIÓN

3.2.3.1 | Respuesta inmune asociada a la vacunación contra *Clostridium*

Las vacunas clostridiales, destinadas al ganado bovino y ovino, han contribuido a controlar la incidencia de las enfermedades clostridiales durante varias décadas. En países donde existe una vacunación regular del ganado estas enfermedades casi han desaparecido, demostrando así que las vacunas disponibles comercialmente inducen una inmunidad protectiva. Sin embargo, las vacunas policlostridiales varían significativamente en su capacidad para inducir inmunidad protectiva contra los diferentes clostridios (Crichton et al., 1986; Green et al., 1987). Sumado a esto, la patogenia producida por los diferentes clostridios difiere notablemente, por lo que, para algunos la clave para una protección duradera puede ser el desarrollo de una memoria inmunológica fuerte, que permita el desarrollo rápido de anticuerpos después de la infección. En cambio, para otros donde la enfermedad está asociada a la presencia de una toxina preformada, como es botulismo o tétanos, es esencial un umbral de anticuerpos específicos para la rápida neutralización de la toxina. Pese a estas consideraciones, los anticuerpos IgG contra *Clostridium* spp. son considerados, en general, el principal correlato de la protección inducida por la vacuna. Sin embargo, los reportes que describen el desarrollo de la respuesta humoral contra los diferentes antígenos de las vacunas policlostridiales, y la evolución temporal de los anticuerpos circulantes en las especies destino, son escasos y la información aportada es parcial. Sumado a ello, los reportes sobre el estudio de la respuesta celular y de memoria inducidas por las vacunas policlostridiales son prácticamente inexistentes.

En este marco, nos planteamos estudiar la respuesta inmune asociada a la protección inducida por la vacunación contra *Clostridium* spp.. Para ello, en una primera instancia nos enfocamos en estudiar en el marco del "*Ensayo A*", la respuesta humoral, en ovinos, contra todos los clostridios incluidos en las vacunas policlostridiales, y su evolución temporal. Uno de nuestros

principales resultados fue que las vacunas estudiadas (la experimental y la de referencia) inducen una respuesta humoral de IgG contra cada una de las especies de *Clostridium* incluidas en las vacunas, pero los títulos de anticuerpos disminuyen a los 90 dpv, alcanzando niveles prácticamente indetectables a los 6 meses para la mayoría de los antígenos. Estos resultados fueron publicados en la revista Veterinary Immunology and Immunopathology, y constituyó el primer reporte que muestra la respuesta individual de anticuerpos contra todos los componentes de una vacuna clostridial polivalente. En un reporte, Cerviño y colaboradores reportaron el desarrollo de la respuesta de anticuerpos contra todos los antígenos incluidos en dos vacunas multicomponentes (8 y 10-valente). Sin embargo, los resultados son menos conclusivos ya que en el estudio fueron utilizados pooles de sueros en lugar de muestras individuales (Cerviño et al., 2011) a sabiendas de la gran variabilidad inter-individual de los mismos. Generalmente, la respuesta humoral ha sido evaluada contra algunos de los antígenos, siendo *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* tipo B y *C. tetani* los antígenos mayormente estudiados (Frerichs and Gray, 1975; Green et al., 1987; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985). Cabe destacar, que nuestros resultados, al igual que otros surgidos en la bibliografía, titulan anticuerpos IgG totales y no neutralizantes, los cuales serían el correlato de protección más aceptado.

La respuesta de anticuerpos al 36 dpv, luego de dos inmunizaciones, mostró una importante dispersión entre los animales del mismo grupo (vacuna experimental o vacuna de referencia) para todos los antígenos involucrados. Esta variación inter-individual fue reportada previamente en ovinos en el contexto del análisis de la respuesta de anticuerpos contra *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* y *C. tetani* inducida por dos vacunas clostridiales (una 7 y 8-valente) (Kerry and Craig, 1979). Asimismo, Webster y Frank (1985) y Frerichs y Gray (1975) también informaron respuestas de anticuerpos dispersa, en ovinos, contra *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* tipo B, *C. septicum* y *C. tetani*. Sin embargo, los animales de esos estudios no fueron individualizados (Frerichs and Gray, 1975; Webster and Frank, 1985), por lo que no es posible concluir si hubo altos y bajos respondedores frente a esas especies de *Clostridium*. Más recientemente, también se informó de una gran variación en la respuesta de anticuerpos en bovinos vacunados contra *C. botulinum* tipo D en el contexto de una vacuna bivalente (*C. botulinum* tipo C y D) (Steinman et al., 2007).

Por otra parte, el análisis PCA y el de agrupamiento realizado sobre niveles de anticuerpos contra todas las valencias de los animales de los dos grupos vacunados, mostraron que 4 ovinos del grupo de la vacuna experimental surgen como altos respondedores contra los antígenos de *C. tetani* y *C. novyi* tipo B. Un resultado similar fue reportado previamente por Kerry y Craig, quienes habían clasificado los ovinos vacunados con dos vacunas policlostridiales, en función de la respuesta de anticuerpos contra *C. perfringens* tipo D, *C. novyi* y *C. tetani*, en altos y bajos respondedores (Kerry and Craig, 1979). En bovinos, también fueron identificados altos y bajos respondedores en base a la producción de anticuerpos anti-*C.*

difficile en la leche luego de inmunizaciones repetidas con una vacuna monovalente contra este clostridio (Schmautz et al., 2018a). Posiblemente la presencia de altos y bajos respondedores pueda deberse a que después de la vacunación, diferentes factores pueden influir en el desarrollo *in vivo* de respuestas inmunes sistémicas y de mucosas. Los factores genéticos, edad y sexo pueden determinan la capacidad del hospedero de responder a una vacuna. También influyen en el desarrollo de la respuesta a la vacunación los factores ambientales, estrés, nutrición y enfermedades infecciosas (Outteridge, 1993; Schmautz et al., 2018b).

Además, a partir del PCA y del análisis de agrupamiento, surgieron como inmunodominantes los antígenos de *C. tetani* y *C. novyi* tipo B. Para confirmar este resultado, analizamos los datos, pero excluyendo los 4 animales considerados como altos respondedores, y el resultado arrojó que los antígenos de la *C. tetani* y *C. novyi* tipo B aún surgían como inmunodominantes. Las particularidades de estos dos componentes de las vacunas clostridiales polivalentes no han sido estudiadas previamente, y nuestros resultados sugieren que esto debe tenerse en cuenta para la formulación de vacunas más optimizadas.

El antígeno de *C. septicum* fue el que indujo la menor respuesta de anticuerpos. Este resultado fue particularmente inesperado porque ambas vacunas aprobaron la prueba de potencia para este antígeno. Sin embargo, podría estar en línea con un reporte anterior que evaluó la respuesta inducida por 16 lotes de una vacuna pentavalente en ovinos, conejos y cobayos. El estudio encontró que la respuesta de anticuerpos contra *C. septicum* fue la más baja comparada con los otros antígenos (*C. perfringens* tipo D, *C. novyi* tipo B y *C. tetani*) (Webster and Frank, 1985). Consistentemente, Cerviño y colaboradores también informaron que las respuestas de anticuerpos inducidas por una vacuna de 10-valente fueron más altas que las respuestas provocadas por una vacuna de 8-valente para todos los componentes, excepto para *C. septicum*, pero el estudio careció de análisis estadístico (Cerviño et al., 2011).

Las vacunas, experimental y de referencia, mostraron un perfil similar en la respuesta de anticuerpos, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos a lo largo del ensayo (360 días). No obstante, a los 36 dpv fue observada una tendencia de los vacunados con la vacuna experimental a mostrar niveles mayores de anticuerpos que los del grupo vacuna de referencia. Esto podría estar relacionado con el hecho de que los antígenos utilizados para el ELISA fueron los mismos que los utilizados para preparar la vacuna experimental marcando un sesgo hacia respuestas más grandes en el grupo experimental. Para descartar la posibilidad este sesgo, evaluamos la respuesta antitetánica de todos los animales del "*Ensayo A*" usando fragmento C recombinante (Frag C_{rec}) de toxina tetánica como antígeno de sensibilización del ELISA. La respuesta contra Frag C_{rec} fue mayor en el grupo de bovinos que recibieron la vacuna experimental que la observada para el grupo de la vacuna de referencia, lo que sugeriría que las diferencias en las respuestas inducidas por las vacunas no son debidas a los antígenos empleados para analizar la respuesta por ELISA.

Uno de los hallazgos más importante de nuestro trabajo, es que para la mayoría de los antígenos la respuesta fue casi insignificante a los 6 meses después de la vacunación. Este resultado, estaría en concordancia con reportes en bovinos donde detectan, por un lado una respuesta variable de anticuerpos neutralizantes contra los toxoides de *C. botulinum* tipo C y D, y *C. perfringens* D hasta los 6 meses post-vacunación (de Oliveira Júnior et al., 2019); y por otro lado demuestran que sólo un pequeño porcentaje (15 al 31%) del ganado vacunado tenía niveles de anticuerpos significativos contra *C. botulinum* tipo D al momento del refuerzo anual (Steinman et al., 2007). Análogamente, fue reportado que la mayoría de cabras vacunadas, con vacuna monovalente contra *C. perfringens* tipo D no presentaban anticuerpos por encima de los valores de corte a los 98 días de la vacunación (Uzal et al., 1998). Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en esta tesis, nos estarían sugiriendo que los animales podrían haber permanecido sin protección durante un largo período de tiempo antes de la revacunación recomendada. A propósito de esto, Steinman y colaboradores demostraron que la incorporación de un refuerzo a los 6 meses era suficiente para mantener los niveles de anticuerpos por encima de los valores de corte (Steinman et al., 2007). Contrariamente a estos reportes, Troxel y colaboradores detectaron una respuesta de anticuerpos contra *C. perfringens* tipos C y D, y *C. chauvoei* a los 300 dpv en bovinos que habían recibido dos dosis (antes y después del parto) de una vacuna comerciales 7-valente, pero los resultados presentados carecen de significancia estadística (Troxel et al., 1997).

En cuanto a la respuesta humoral en bovinos en el contexto del "*Ensayo A*", los resultados no fueron concluyentes como los observados en ovinos. Luego de dos inmunizaciones, los bovinos del grupo de la vacuna de referencia montaron una respuesta con una gran variación intergrupal. Mientras, que la mayoría de los animales que recibieron la vacuna experimental no indujeron una respuesta contra los antígenos de la vacuna, con la excepción de *C. perfringens* tipo C. Sumado a esto, los animales previo a la sangría de los 90 dpv, sufrieron un encuentro con alguna/s especies de *Clostridium*, lo que posiblemente, haya oficiado de booster dado que en los animales, control y vacunados, fue observado un aumento significativo del título de anticuerpos con respecto al día 36 dpv contra todos los clostridios. El ganado bovino, a diferencia del ovino, se encontraba a campo y en contacto con el resto del ganado del establecimiento rural, por lo que es muy difícil controlar las infecciones naturales.

La corta duración de las respuestas de anticuerpos inducidas por las vacunas clostridiales multivalentes, parecería estar en clara contradicción con la duración de un año de inmunidad propuesta por las vacunas comerciales. Sumado a esto, Uzal reportó que la revacunación del ganado no sería una práctica usual en los establecimientos ganaderos por lo que habría a nivel mundial un bajo cumplimiento del régimen de revacunación anual (Uzal, 2012). Sin embargo, a pesar de la posible falta de revacunación anual y a los bajos niveles de anticuerpos circulantes al año, la ausencia de brotes importantes sugiere que los animales vacunados, en general, están protegidos probablemente por el desarrollo de una respuesta de memoria a largo plazo,

que permitiría respuestas secundarias rápidas que protejan a los animales frente a un desafío natural. Resultados obtenidos en el marco de una tesina de grado llevada a cabo en nuestro laboratorio, demostraron que bovinos vacunados con una vacuna policlostridial y revacunados al año, fueron capaces de inducir un rápido e importante aumento del título de anticuerpos contra *C. chauvoei* (Rivera, 2014). Asimismo, fue reportado el desarrollo de una respuesta secundaria anti-*C. botulinum* tipo D luego la revacunación al año en bovinos (Steinman et al., 2007). Las respuestas celulares de memoria frente a la vacunación clostridial en el ganado no han sido descritas en la bibliografía. Sin embargo estudios desarrollados en ratones demostraron que se induce una respuesta de células B de memoria, productoras de anticuerpos neutralizantes que confieren protección uno frente a la vacunación contra *C. difficile* y otro contra *C. botulinum* (Devera et al., 2015; Sahay et al., 2018).

A pesar de los avances en el campo de la inmunología y la vacunación, la mayoría de las vacunas actuales humanas y veterinarias son evaluadas, en base a la magnitud de los títulos de anticuerpos antígeno específicos, en suero o mucosa, después de la vacunación (Sarkander et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados, conjuntamente con los reportes previos, sugieren que los animales posiblemente no estén protegidos al año o que los anticuerpos circulantes no son un "*biomarcador*" apropiado de inmunidad protectiva en los animales vacunados, como en general es aceptado. En función de ello, y con el objetivo de avanzar en la caracterización de la respuesta inmune inducida por la vacunación nos propusimos estudiar las respuestas celulares inducidas por la vacunación policlostridial. Para esto, analizamos la expresión génica de citoquinas en sangre entera de ovinos y bovinos, vacunados y naïve, frente a la re-estimulación específica.

Los antígenos seleccionados para re-estimular las muestras del "*Ensayo A*" fueron los de *C. chauvoei*, *C. perfringens* tipo D y *C. septicum*, mientras que el "*Ensayo B*" fue re-estimulado solo con el antígeno de *C. chauvoei*. Para la elección de antígenos fue consultado el personal idóneo de la empresa productora de las vacunas, quienes nos sugirieron utilizar estos tres clostridios ya que son los que presentan mayor prevalencia en nuestro país. Normalmente estos antígenos, que incluyen potentes toxinas, son inactivados mediante el agregado de formol, que inactiva las toxinas mediante la formación de enlaces covalentes con varios grupos funcionales (-NH2, -OH2, -COOH y -SH) (Tortora et al., 2007). Sin embargo, para asegurarnos una adecuada captación de los antígenos, éstos fueron utilizados sin formol, y previo a su uso fueron inactivados por calor para evitar que las toxinas lisaran las células mediante la formación de poros. Para evitar la estimulación inespecífica debida a los medios de cultivo complejos en los cuales son preparados los antígenos, las toxinas de *C. perfringens* tipo D y *C. septicum* fueron dializados contra PBS previo a su uso. De igual modo, el antígeno de *C. chauvoei* fue lavado con PBS para eliminar restos el medio de cultivo antes de procesarlo (Sección 2.2.2 de M&M).

Los resultados obtenidos en el contexto del "*Ensayo A*" mostraron que solo la expresión de IFN-γ fue modificada en respuesta a la re-estimulación con los antígenos clostridiales. En particular en ovinos, *C. chauvoei* y *C. septicum* indujeron un aumento significativo de la expresión de del ARNm de IFN-γ en el grupo vacuna experimental. La respuesta de IFN-γ frente a *C. perfringens* tipo D no mostró diferencias significativas, sin embargo, fue observada una tendencia a expresar mayores niveles del ARNm de IFN-γ en el grupo de la vacuna experimental. En los bovinos, observamos una tendencia similar a la de los ovinos para los tres antígenos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Estos resultados, nos llevó a replantearnos si no estaríamos sesgando la respuesta al estimular con los antígenos incluidos en la vacuna experimental. Sin embargo, la estimulación policlonal, y por ende inespecífica, también indujo niveles de expresión del ARNm de IFN-γ significativamente mayores en los animales del grupo vacuna experimental, sugiriéndonos que esta respuesta estaría asociada a la vacuna experimental y no a los antígenos utilizados para estimular.

En particular, hemos demostrado que *C. septicum* estimuló *in vitro* la expresión del ARNm de IFN-γ en ambas especies vacunadas con la vacuna experimental, observándose diferencias significativas con el grupo vacuna referencia y grupo control. Entonces, puede destacarse que los antígenos de este clostridio, inducen por un lado una baja respuesta de anticuerpos y una respuesta celular pro-inflamatoria tipo Th1, ambas específicas. Este resultado fue inesperado dado que, si bien son necesarios realizar otros estudios, podría sugerirse que a diferencia de los otros *Clostridium*, la respuesta contra *C. septicum* es esencialmente celular con baja producción de anticuerpos.

La respuesta contra *C. chauvoei* fue analizada en los dos ensayos de vacunación y si bien en ambos fue observado un perfil pro-inflamatorio, caracterizado por la expresión de IFN-γ, cabe destacar que en el "*Ensayo B*" además fue inducida la expresión de otras citoquinas como IL-17, TNF-α y TGF-β1. El aumento de los niveles de expresión de estas cuatro citoquinas fue significativo al comparar los animales vacunados pre y post-vacunación (0 y 69 dpv). Estos resultados están en concordancia con un reporte previo que describe que la forma vegetativa de este clostridio era capaz de sobrevivir en macrófagos bovinos, derivados de monocitos, e inducir la expresión del ARNm de IL-12 e IL-23 (Pires et al., 2017), citoquinas inductoras de respuestas Th1 y Th17, respectivamente. Además, observamos el aumento en la expresión de TGF-β, que si bien es una citoquina anti-inflamatoria, en presencia de IL-6 o IL-1β podría promover el desarrollo de una respuesta Th17 (Murphy and Weaver, 2017), sin embargo no tenemos indicios de la expresión de estos ARNm ya que no fueron cuantificadas por qPCR. Por su parte, TNF-α es principalmente un inductor de inflamación, producido al inicio de la infección por las células inmunes innatas, pero luego también es producido por las células T efectoras, que favorece el reclutamiento de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Murphy and Weaver, 2017).

La expresión del ARNm de IFN-γ fue estimulada en los animales vacunados con la vacuna experimental, por los dos de los tres antígenos analizados (*C. chauvoei* y *C. septicum*), tanto en ovinos como bovinos y en ambos ensayos de vacunación. En particular, el IFN-γ es una citoquina típicamente pro-inflamatoria, que la expresan las células tipo Th1 y NK, promueve inflamación activando de macrófagos, la atracción de neutrófilos y macrófagos al sitio de infección. El aumento en la expresión del ARNm de IFN-γ o su secreción había sido reportada previamente como resultado de infecciones con algunos clostridios como por ejemplo: *C. difficile* en humanos (Péchiné and Collignon, 2016; Popoff, 2018); con *C. perfringens* en una línea de macrófagos murinos (Wallace et al., 1999), en cerdos (Shi et al., 2019), en pollos (Park et al., 2008); y con *C. tetani* en humanos (Torabi Goudarzi et al., 2016). Asimismo, se ha reportado el aumento de la expresión o secreción de IFN-γ en ratones o bovinos vacunados contra las toxinas de *C. perfringens* (Ding et al., 2019) o contra *C. difficile* (Schmautz et al., 2018b), respectivamente, en comparación con los animales control. La expresión del IFN-γ como un posible biomarcador de la vacunación clostridial nos brindaría una herramienta para profundizar el estudio de las respuestas celulares y de memoria a largo plazo.

3.2.3.2 | Respuesta inmune asociada a la protección contra *Clostridium*

En el último objetivo de esta tesis nos orientamos a evaluar si la respuesta inmune inducida por la vacunación policlostridial en bovinos es una respuesta protectiva contra uno de los clostridios de mayor importancia epidemiológica como lo es *C. chauvoei*. La infección de bovinos con este clostridio provoca dos enfermedades, el carbunclo sintomático o “mancha” y la gangrena gaseosa. Las esporas de este clostridio ingresan vía oral o mediante heridas y se disemina al resto del organismo por vía sanguínea. Las esporas permanecen latentes hasta encontrar condiciones de anaerobiosis que permitan su germinación, con la consecuente multiplicación del microorganismo y la producción de toxinas. A las 24 horas de su germinación, las lesiones se hacen evidentes y los animales afectados presentan inflamaciones crepitantes en la musculatura, particularmente en las extremidades, con una extensión rígida característica de los miembros. Finalmente, 1 a 3 días después la aparición de los síntomas puede desarrollarse una bacteriemia que provoca la muerte del animal (Rood et al., 1997; Useh et al., 2003).

Para llevar a cabo este objetivo, nos centramos en estudiar la respuesta inmune de los bovinos, vacunados y naïve, desafiados con *C. chauvoei* provenientes del “*Ensayo B*”. A partir de los datos del desafío, donde pudimos observar todos los bovinos vacunados resultaron protegidos, y de los resultados de la respuesta inmune previa al desafío (69 dpv), podemos sugerir que la protección inducida por la vacuna podría ser asociada al desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria Th1/Th17 y humoral específica. En los animales control, que enfermaron y murieron entre las 48 y 72 h, no fue observado de la inoculación, no fue observada esta respuesta.

Los reportes sobre la respuesta humoral protectiva no son concluyentes, algunos autores sostienen que se caracterizaría principalmente por una respuesta temprana de IgM, que no permanecería en el tiempo, seguida de una repuesta de IgG que sería la que efectivamente conferiría la protección contra *C. chauvoei* (Chandler, 1975). Sin embargo, otros autores, sostienen que la respuesta de IgM también sería importante en la protección (Tanaka et al., 1987). Luego del desafío, nuestros resultados mostraron una leve tendencia a disminuir el título de anticuerpos en el grupo vacunado, pero la diferencia no fue significativa con respecto al pre-desafío. La posible disminución podría estar asociada al consumo de los anticuerpos ante la presencia del *C. chauvoei*.

Para caracterizar mecanismos efectores contra *C. chauvoei* analizamos la respuesta inmune a las 24 h post-desafío (70 dpv), y observamos que en los animales protegidos la respuesta inmune fue regulada negativamente. Además, observamos que el desafío indujo la inhibición a nivel de la proliferación policlonal de las células T $CD4^+$ y T $CD8^+$ tanto en los animales vacunados como en los controles. En el grupo control no fueron observadas diferencias en el índice de proliferación, pre y post-desafío, probablemente a que este grupo sólo incluía tres animales, sin embargo, pudo observarse tendencia es bien clara. En cuanto a los linfocitos B, esta población también mostró una tendencia a una menor proliferación aunque las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, también observamos que el desafío inhibió la expresión, antígeno específica de ARNm de las citoquinas que había estimulado la vacunación. Así, la expresión de los ARNm de IFN-γ, IL-17 y TNF-α aparecen como inhibidas, alcanzando valores similares o por debajo del grupo control al día 0 (condición utilizada como "*calibradora*" para cuantificar la expresión de los ARNm). La expresión de TGF-β fue estimulada en respuesta al antígeno de *C. chauvoei* en bovinos vacunados, y posteriormente fue inhibida por el desafío. Sin embargo, es importante tener en cuenta que TGF-β se sintetiza como un precursor inactivo y el control de su expresión es a nivel post-traduccional (Kabelitz, 2011), por lo que pensamos que. Además, IL-4 e IL-10 surgieron modificadas, su expresión fue estimulada por la vacunación, y después del desafío la expresión de sus ARNm fue inhibida al comparar con el día pre-desafío. Por otra parte, el grupo control también mostró una tendencia clara, luego del desafío, a reprimir la expresión de los ARNm de las citoquinas analizadas. En suma, nuestros resultados nos sugieren que la inhibición de la proliferación y de la expresión de citoquinas por parte de los linfocitos circulantes es producto del desafío con *C. chauvoei* y no de la vacunación contra este clostridio, dado que los animales control muestran la misma tendencia que los vacunados.

En una primera instancia, nuestro objetivo fue evaluar la capacidad de los linfocitos circulantes de proliferar frente al antígeno específico, sin embargo nos encontramos con que la gran mayoría de los PBMCs estimulados con el antígeno de *C. chauvoei* estaban muertos. Como se mencionó previamente, las muestras fueron fijadas con paraformaldehído por lo que no

pudimos analizar el porcentaje de células viables después de la estimulación. El antígeno *C. chauvoei* utilizado para analizar la linfoproliferación fue el mismo que se utilizó para analizar el perfil de expresión génica por qPCR, a partir de la cual se observó una respuesta de citoquinas frente al antígeno. Sin embargo, ambas plataformas se diferencian en que para el análisis de la expresión génica se cultiva sangre entera con el antígeno, mientras que para linfoproliferación se purifican los PBMCs y se cultivan con el antígeno. Cuando utilizamos sangre entera de animales vacunados seguramente hay anticuerpos específicos neutralizantes que impiden que las toxinas actúen, mientras que cuando purificamos los PBMC perdemos todos los factores solubles, como anticuerpos y citoquinas, que puedan inhibir la acción de las toxinas.

C. chauvoei produce dos potentes toxinas formadoras de poros tipo β, la chauveolisina y toxina A (CctA). La chauveolisina es una citolisina dependiente de colesterol (CDC), que al igual que otras CDC clostridiales están involucradas principalmente en lesiones de gangrena, promoviendo la destrucción del tejido y previniendo la lisis bacteriana por parte de las células inmunes del huésped. El prototipo de la familia CDC es la perfringolisina (PFO) de *C. perfringens*. El miembro más estudiado de la familia de las citolisinas es la PFO producida por *C. perfringens*. La PFO en altas concentraciones es citotóxica para leucocitos polimorfonucleares (PMNL) y macrófagos, mientras que bajas concentraciones interfiere con el estallido respiratorio, y la fagocitosis de partículas por los PMNL (Popoff, 2016). En la periferia de las lesiones, la PFO, a concentraciones sub-letales, reduce la migración de PMNL y macrófagos, e induce su adherencia a las células endoteliales, logrando así la acumulación de PMNL y macrófagos en los vasos alrededor del sitio de infección y la ausencia de células inflamatorias en el sitio de infección (Popoff, 2014). Por otro lado, la CctA es una toxina que está íntimamente relacionada (50% de similitud) con la α-toxina de *Staphylococcus aureus* (Popoff, 2016). Ha sido reportado que la α-toxina de *S. aureus* puede lisar una amplia gama de células e inducir apoptosis en linfocitos T (Haslinger et al., 2003). Altas concentraciones de la α-toxina producen principalmente necrosis de las células objetivo, mientras que las concentraciones sub-líticas inducen predominantemente apoptosis, y/o una respuesta inflamatoria en las células objetivo (Thay et al., 2013). Dada la similitud con la α-toxina de *S. aureus*, se sugiere que la CctA probablemente comparta el modo de acción con esta toxina, sin embargo, solo se ha reportado que es citotóxica para las células epiteliales, que induce la activación de la caspasa 1 y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y que fuertemente hemolítica con glóbulos rojos de oveja (Popoff, 2016). Además, ha sido reportado que anticuerpos anti-CctA neutralizan la actividad citotóxica y hemolítica del sobrenadante crudo del cultivo de *C. chauvoei*, y además que la vacunación con CctA recombinante protege completamente a los animales contra un desafío con *C. chauvoei* virulento (Nicholson et al., 2019; Popoff, 2016). En función de estos reportes, nosotros pensamos que la muerte de los PBMC estimulados con el antígeno de *C. chauvoei* podría haberse debido a que la inactivación por calor fue insuficiente, y entonces los PBMCs pudieron haber sido el blanco de las toxinas

de este clostridio, no ocurriendo esto cuando utilizamos sangre entera para analizar la expresión de citoquinas.

Por otra parte, los animales vacunados y control fueron desafiados intramuscularmente con una suspensión de esporas de *C. chauvoei*, las cuales se caracterizan por tener la capacidad de esperar las condiciones adecuadas de anaerobiosis para germinar a nivel muscular. En general, se consideraba que los clostridios patogénicos eran exclusivamente extracelulares, sin embargo, ha sido reportado que las esporas de *C. difficile* y *C. perfringens* sobreviven dentro de los macrófagos murinos hasta 72 h después de la infección (O'Brien and Melville, 2000; Paredes-Sabja et al., 2012). Recientemente, también fue demostrado que *C. chauvoei* sobrevive en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica debovinos. Además, fue reportado que si estos macrófagos son infectados con la forma vegetativa inducen un perfil de expresión génica pro-inflamatorio (IL-12 e IL-23), mientras que aquellos infectados con esporas muestran un perfil anti-inflamatorio (IL-10 y TGF-β) (Pires et al., 2017). Frente a estos reportes, se ha sugerido que los macrófagos probablemente no reconozcan la infección con esporas debido a que mantienen un metabolismo basal muy bajo, y en consecuencia las esporas utilizarían a dichos macrófagos para sobrevivir y diseminarse por el organismo sin disparar una respuesta inflamatoria (Paredes-Sabja et al., 2012). En este contexto, podríamos pensar que la atenuación de la respuesta celular de bovinos asociado al desafío con esporas de *C. chauvoei*, pudiera ser consecuencia del ambiente anti-inflamatorio inducido por los macrófagos infectados con esporas. Por otro lado, ha sido reportado que las citoquinas IL-10 y TGF-β, conjuntamente con la arginina tipo I y II, inducen la activación de macrófagos M2 en bovinos (Castillo-Velázquez et al., 2013; Hussen and Schuberth, 2017; Jenvey et al., 2019). En humanos, estas citoquinas inducen la activación de macrófagos M2c quienes a su vez, secretan IL-10 y TGF-β promoviendo el desarrollo de una respuesta Th2 y Treg (Duque and Descoteaux, 2014). En este contexto, nuestros resultados no arrojaron altos niveles de expresión de IL-10 y TGF-β sino que por el contrario sus expresiones surgieron como inhibidas. Sin embargo, en función de esto debemos considerar varios puntos:

1) Los resultados de la linfoproliferación y del perfil de expresión génica de citoquinas son una "*fotografía*" tomada en PBMC purificados y sangre entera, respectivamente, a las 24 h de la inoculación de las esporas. Por consiguiente, es complejo sacar una hipótesis sobre la atenuación de la respuesta celular luego del desafío.

2) Por otra parte, cabe destacar que entendemos que en el contexto del "*Ensayo B*" la estrategia experimental más adecuada para evaluar el perfil de expresión génica de citoquinas hubiese sido directamente en muestras de sangre, dado que los bovinos habían sido estimulados *in vivo* con la descarga del desafío. Sin embargo, dada la importancia de las muestras de este tipo de ensayo decidimos realizar la estimulación *in vitro*. Los resultados

obtenidos avalaron la estrategia experimental, dado que no mostraron diferencias en la condición PBS entre los grupos vacunado y control.

3) En esta tesis no evaluamos poblaciones purificadas, sino que utilizamos sangre entera, por lo que podemos sugerir que el efecto anti-inflamatorio (IL-10 y TGF-β) de los monocitos/macrófagos infectados con esporas no lo hayamos visto, dado que estas células se encuentran en una baja proporción en los PBL o porque la "*fotografía*" no fue tomada en el momento adecuado.

4) En nuestro trabajo solo evaluamos la expresión génica de TGF-β, por lo que no podemos inferir sobre la presencia o ausencia de su forma activa que es en definitiva la responsable de su accionar.

5) Si bien nuestros resultados nos sugieren la presencia de células en sangre periférica con un perfil regulatorio o tolerogénico, no debemos de olvidarnos que la vacuna indujo una inmunidad protectiva ya que los animales vacunados, si bien manifestaron síntomas, todos evolucionaron favorablemente. Por lo que, podemos sugerir que la "*fotografía*" tomada a las 24 h de inoculación mostró un perfil regulatorio que luego se resolvió. Para comprender como el sistema inmune de los animales vacunados controla el desafío con *C. chauvoei*, seguramente, serían de gran aporte los datos obtenidos a las pocas horas de la inoculación y luego de las 48 a 72 h, cuando la respuesta efectora ha controlado la infección y han cesado las manifestaciones clínicas.

6) Nuestros resultados nos sugieren la presencia de células con un perfil regulatorio o tolerogénico a las 24 h post-desafío, y si bien su naturaleza aún resta por definir debemos tener presente que las células Tγδ son una de las principales poblaciones en sangre periférica, de hecho, constituyen del 15% al 60% de las células mononucleares de la sangre periférica, principalmente en bovinos jóvenes. Sumado a ello, hay una serie de reportes que las catalogan como la principal población con funciones regulatorias en bovinos, demostrando que los distintos subset de las células Tγδ WC1.1$^+$, WC1.2$^+$y WC1$_{neg}$ pueden suprimir la proliferación de las células T CD4$^+$ y CD8$^+$ y su producción de IFN-γ a través de la secreción de las citoquinas anti-inflamatorias TGF-β e IL-10 (Hussen and Schuberth, 2017; Jenvey et al., 2019; Kabelitz, 2011; Telfer and Baldwin, 2015). Por lo tanto, las células Tγδ tienen la capacidad de inducir y limitar las respuestas inflamatorias como resultado de la infección y de la vacunación (revisado por (Baldwin et al., 2019)). Inicialmente, en este trabajo, nos propusimos analizar las células Tγδ, por lo mencionado previamente, y porque además no existen reportes bibliográficos que relacionen las células Tγδ bovinas con la infección o vacunación con *Clostridium* spp.. Sin embargo, no fue posible analizarlas dado que si bien contamos con el anti "pan reactivo" WC1 (CC15) conjugado a FITC y que ha sido utilizado con éxito en otros ensayos, en los experimento de linfoproliferación utilizamos CFSE que se adquiere en el mismo canal de

fluorescencia. Como se mencionó anteriormente los anticuerpos para bovinos están conjugados a unos pocos fluoróforos por lo que su utilización se ve limitada.

CAPITULO 4:

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las vacunas veterinarias contra la fiebre aftosa y las clostridiosis son la principal medida profiláctica aplicada en el ganado. Para ambas vacunas, en general es aceptado que el principal correlato de protección son los anticuerpos, sin embargo ha sido reportado que la inducción de una respuesta de anticuerpos específicos no siempre asegura la inmunidad ni la protección de los animales. Por todo ello, es entendido de que la identificación de correlatos inmunes más precisos de la eficacia de una vacuna, es uno de los puntos de mayor relevancia para el desarrollo de nuevas vacunas y para la optimización de las estrategias de inmunización de las vacunas ya disponibles. En este contexto, este trabajo nos centramos en ensayos de vacunación de bovinos y ovinos contra el virus de la fiebre aftosa y contra las variedades de clostridios que afectan a rumiantes, con el objetivo de avanzar en el conocimiento de las respuestas inmunes protectivas en estas especies, intentando aportar a la definición de correlatos inmunes más precisos contra estas enfermedades.

Se establecieron dos grandes bloques donde abordamos en uno la respuesta asociada a la vacunación contra la aftosa y en el otro contra las enfermedades clostridiales. Para ambos modelos fue necesario optimizar diferentes técnicas y protocolos (cultivos a partir de sangre entera, RT-qPCR, Microarray y su análisis, ELISAs, FACS y ensayos de linfoproliferación) que nos permitieran analizar las respuestas contra estas vacunas tanto en bovinos como en ovinos. La optimización de estas técnicas es un valor agregado de este trabajo dado que no se contaba con estas técnicas optimizadas en el laboratorio.

Los experimentos fueron realizados en el marco de colaboraciones con dos empresas productoras de vacunas veterinarias, una local y otra regional. Estas colaboraciones nos permitieron acceder a ensayos en especies veterinarias sobre los cuales fue posible plantearse la realización de los proyectos de investigación descritos en esta tesis. La generación de conocimiento de la respuesta inmune en grandes animales, como bovinos y ovinos, es de gran importancia, dado que el conocimiento en estas especies es menor y es menos explotado que la investigación en animales de laboratorio, que no siempre reproducen adecuadamente lo que está sucediendo en las especies de destino.

En el modelo de aftosa, evaluamos la respuesta transcripcional global de bovinos vacunados y desafiados para establecer marcadores moleculares inmunológicos asociados a la protección efectiva contra la infección por el virus. Para esto, primeramente comprobamos que la expresión del ARNm de IFN-γ, en respuesta al antígeno de FMDV, podía ser empleada como una herramienta de control de la estrategia experimental. Esto nos permitió confirmar, en todos los ensayos evaluados en este trabajo, que el IFN-γ es un buen marcador de vacunación, que nos permite distinguir entre animales vacunados y naïve, como había sido descrito previamente para la forma proteica de esta citoquina. Por el contrario, por RT-qPCR no pudimos concluir sobre una asociación entre esta citoquina y la protección inducida por la vacuna previo al desafío, dado que sólo observamos una tendencia.

La comparación de la respuesta transcripcional a partir de sangre estimulada con el antígeno de FMDV a los 30 dpv de bovinos naïve, vacunados y desafiados, nos permitió definir dos "*firmas moleculares*". Una "*firma molecular*" asociada a la vacunación contra FMDV que cuenta con 26 genes marcadores que diferencian animales vacunados de animales naïve. La segunda "*firma molecular*" es un set de 9 genes que está asociada a la respuesta protectiva contra FMDV y diferencia animales vacunados que serán protegidos de los que no serán protegidos frente a un desafío con FMDV. A partir de estos resultados, y a manera de perspectiva, nos planteamos validar ambas "*firmas moleculares*" para esto nos consideramos una serie de puntos como son: a) Analizar un mayor número de animales, provenientes tanto de diferentes ensayos de vacunación y desafío contra FMDV como de animales a campo. b) Valorar el estado portador del virus, donde aproximadamente el 60% de los vacunados y no vacunados se vuelven portadores. En este sentido, nos planteamos analizar estos biomarcadores previo al establecimiento del estado portador y determinar si son capaces de diferenciarlos. c) Evaluar ambas "*firmas moleculares*" en el contexto de vacunas de emergencia, que presentan una mayor potencia, de forma de conseguir diferenciar los bovinos eficazmente vacunados de una manera más rápida que los ensayos de potencia tradiciones, y por tanto mejorar los procesos de control de las vacunas. Por último, consideramos que datos obtenidos a partir de otras *Omicas* y la aplicación de la *Biología de sistemas* aportarían un valor agregado a la definición de estas "*firmas moleculares*" asociadas a la vacunación contra FMDV. La validación de estos biomarcadores nos permitirá contar con una importante herramienta, alternativa a los métodos tradicionales, para evaluar la eficacia de estas vacunas.

Además destacar, que asociados a ambas firmas surgieron funciones y vías biológicas que abren un abanico de información extremadamente útil para estudiar los mecanismos inmunes inducidos por la vacunación contra FMDV.

Los resultados obtenidos en el modelo de fiebre aftosa constituyen uno de los principales logros de esta tesis, fundamentalmente porque la estrategia experimental planteada para el desarrollo de este objetivo implicó: a) uno de los patógenos de mayor importancia a nivel mundial en animales grandes, como lo es la fiebre aftosa y sobre el cual existen múltiples restricciones para trabajar; b) el trabajo con animales a campo que supone una gran variabilidad intergrupal; c) la necesidad de agrupar animales provenientes de diferentes ensayos; d) la realización simultánea de la optimización de técnicas para analizar la respuesta transcripcional global y de búsqueda de la mejor preparación antigénica; y e) la interrelación entre dos instituciones (privada y pública) y entre dos países con reglamentaciones diferentes.

En relación a la respuesta inmune asociada a la protección inducida por vacunas policlostridiales, demostramos que éstas inducen una respuesta de anticuerpos contra todos los clostridios, incluidos en ella, con una gran variación inter-individual. Sin embargo, la respuesta contra la mayoría de los antígenos disminuyó, a niveles prácticamente indetectables,

a los 6 meses post vacunación, sugiriéndonos que, si bien el esquema de revacunación anual es considerado eficaz controlando la enfermedad clostridial, los anticuerpos circulantes no serían el único correlato de protección. Para aproximarnos al estudio en este aspecto, determinamos que esta respuesta de anticuerpos, es acompañada por una respuesta celular inflamatoria tipo Th1/Th17, que en respuesta a la re-estimulación antigénica y policlonal, expresa citoquinas pro-inflamatorias IFN-γ, IL-17, TNF-α y TGF-β1. Además, nuestros resultados mostraron que a las 24 h del desafío de bovinos vacunados, con esporas de *C. chauvoei* (especie incluida en la vacuna), se indujo una inhibición de la proliferación policlonal de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, y de la expresión de los ARNm de IFN-γ, IL-17, IL-4, TNF-α y TGF-β. Por su parte, los niveles de anticuerpos no variaron significativamente con el desafío.

En función de estos resultados, nos planteamos a futuro profundizar el conocimiento sobre la respuesta celulares inducidas por las vacunas policlostridiales. En este sentido, planificamos evaluar a tiempos tempranos si la vacunación modifica poblaciones celulares como ser células T, B y granulocitos. Del mismo modo, nos planteamos determinar que otras poblaciones son modificadas en respuesta al desafío y si la inhibición de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ observada frente a la estimulación policlonal es revertida y en qué momento, para ello deberíamos analizar a diferentes tiempos post desafío. Para esto, contamos en el laboratorio con la técnica optimizada de FACS con paneles de anticuerpos específicos para detectar poblaciones celulares como la de células Tγδ, NK y granulocitos, tanto para bovinos como para ovinos.

Asimismo, nos planteamos analizar en ensayos futuros la respuesta específica contra *C. chauvoei* dado que los resultados de linfoproliferación fueron obtenidos mediante la estimulación con ConA. Para esto, debemos obtener un antígeno adecuado que estimule los PBMC sin causar su muerte, y una posible estrategia podría ser utilizar alguna de sus toxinas recombinantes a las cuales se les haya modificado su citotoxicidad.

La expresión de IFN-γ asociado a la vacunación clostridial nos abre un camino sobre el que podremos evaluar las respuestas celulares y memoria a largo plazo. Empleando la técnica de ELISpot a partir de ensayos de vacunación a largo plazo, y en los cual sea incluida la revacunación anual, nos planteamos determinar hasta qué momento hay células circulantes capaces de liberar IFN-γ, y si la revacunación anual induce una respuesta de células T memoria específica.

En este trabajo, analizamos la respuesta protectiva contra uno de los 9 clostridios (*C. chauvoei*) incluidos en la vacuna, por lo que el análisis de ensayos de desafío con los otros clostridios surge como un punto importante para determinar si los diferentes clostridios inducen una respuesta similar entre sí y a la observada en esta tesis.

Por último, destacamos la importancia de la generación de conocimiento básico de la respuesta inmune en las especies de destino, que presenta características distintivas como ser el rol y la

proporción de las células Tγδ. (Robinson et al., 2016). La importancia potencial de las células Tγδ reguladoras en respuesta a la vacunación en el ganado se ha subestimado hasta ahora, y consideramos que debería ser investigado su rol tanto en la infección por el FMDV o por *Clostridium* spp., como en la vacunación contra estas enfermedades. La generación de conocimiento en el contexto de estas vacunas podría tener implicancias importantes para el diseño de vacunas de nuevas vacunas para el mejoramiento de las ya existentes.

En suma, avanzamos en el conocimiento de las respuestas inducidas por vacunas contra enfermedades veterinarias y definimos posibles candidatos de correlatos inmunológicos de protección en especies de destino. En tal sentido, esperamos contribuir al área aportando herramientas para mejorar los métodos de evaluación de eficacia de éstas vacunas a nivel de industrias productoras de vacunas y organismos reguladores.

CAPITULO 5:

BIBLIOGRAFÍA

Abubakar, M., Manzoor, S., Ahmed, A., 2018. Interplay of foot and mouth disease virus with cell-mediated and humoral immunity of host. Rev. Med. Virol. 28, 1–8.

Adams, L.G., Khare, S., Lawhon, S.D., Rossetti, C.A., Lewin, H.A., Lipton, M.S., Turse, J.E., Wylie, D.C., Bai, Y., Drake, K.L., 2011. Enhancing the role of veterinary vaccines reducing zoonotic diseases of humans: Linking systems biology with vaccine development. Vaccine 29, 7197–7206. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.080

Agol, V.I., Gmyl, A.P., 2010. Viral security proteins: Counteracting host defences. Nat. Rev. Microbiol. https://doi.org/10.1038/nrmicro2452

Ait-Ali, T., Díaz, I., Soldevila, F., Cano, E., Li, Y., Wilson, A.D., Giotti, B., Archibald, A.L., Mateu, E., Darwich, L., 2016. Distinct functional enrichment of transcriptional signatures in pigs with high and low IFN-gamma responses after vaccination with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). Vet. Res. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0392-3

Alcaraz-López, O.A., Villarreal-Morales, Y., Rangel-Escareño, C., Gutiérrez-Pabello, J.A., 2020. Assessment of candidate biomarkers to detect resistance to Mycobacterium bovis in Holstein-Friesian cattle. Res. Vet. Sci. 132, 416–425. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.016

Aldape, M.J., Bayer, C.R., Bryant, A.E., Stevens, D.L., 2016. A novel murine model of Clostridium sordellii myonecrosis: Insights into the pathogenesis of disease. Anaerobe 38, 103–110. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.01.004

Aldape, M.J., Bryant, A.E., Katahira, E.J., Hajjar, A.M., Finegold, S.M., Ma, Y., Stevens, D.L., 2010. Innate immune recognition of, and response to, Clostridium sordellii. Anaerobe 16, 125–130. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.06.004

Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I., Garland, A.J.M., 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. J. Comp. Pathol. 129, 1–36.

Alves, M.P., Guzylack-Piriou, L., Juillard, V., Audonnet, J.C., Doel, T., Dawson, H., Golde, W.T., Gerber, H., Peduto, N., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2009. Innate immune defenses induced by CpG do not promote vaccine-induced protection against foot-and-mouth disease virus in pigs. Clin. Vaccine Immunol. 16, 1151–1157. https://doi.org/10.1128/CVI.00018-09

Archetti, I.L., Amadori, M., Donn, A., Salt, J., Lodetti, E., 1995. Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle by Assessment of Antibody Response in Oropharyngeal Fluids, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.

Aronoff, D.M., 2013. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease. Anaerobe 24, 98–101. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.08.009

Arzt, J., Baxt, B., Grubman, M.J., Jackson, T., Juleff, N., Rhyan, J., Rieder, E., Waters, R., Rodriguez, L.L., 2011. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus-Host Interactions. Transbound. Emerg. Dis. 58, 305–326.

Arzt, J., Belsham, G.J., Lohse, L., Bøtner, A., Stenfeldt, C., 2018. Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid. mSphere 3, e0210847. https://doi.org/10.1128/mSphere.00365-18

Arzt, J., Fish, I., Pauszek, S.J., Johnson, S.L., Chain, P.S., Rai, D.K., Rieder, E., Goldberg, T.L., Rodriguez, L.L., StenfeldtID, C., 2019. The evolution of a super-swarm of foot-and-mouth disease virus in cattle. PLoS One 14, e0210847. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210847

Arzt, J., Pacheco, J.M., Rodriguez, L.L., 2010. The Early Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Cattle After Aerosol Inoculation. Vet. Pathol. 47, 1048–1063. https://doi.org/10.1177/0300985810372509

Arzt, J., Pacheco, J.M., Smoliga, G.R., Tucker, M.T., Bishop, E., Pauszek, S.J., Hartwig, E.J., Santos, T. de los, Rodriguez, L.L., 2014. Foot-and-mouth disease virus virulence in cattle is co-determined by viral replication dynamics and route of infection. Virology 452–453, 12–22. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.001

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature 500, 232–236. https://doi.org/10.1038/nature12331

Baldwin, C.L., Yirsaw, A., Gillespie, A., Le Page, L., Zhang, F., Damani-Yokota, P., Telfer, J.C., 2019. γδ T cells in livestock: Responses to pathogens and vaccine potential. Transbound. Emerg. Dis. 1–10. https://doi.org/10.1111/tbed.13328

Bano, L., Drigo, I., Tonon, E., Berto, G., Tavella, A., Woudstra, C., Capello, K., Agnoletti, F., 2015. Evidence for a natural humoral response in dairy cattle affected by persistent botulism sustained by non-chimeric type C strains. Anaerobe 36, 25–29. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.09.007

Barnard, A.L., Arriens, A., Cox, S., Barnett, P., Kristensen, B., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. Vaccine 23, 1037–1047. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.034

Barnett, P. V., Keel, P., Reid, S., Armstrong, R.M., Statham, R.J., Voyce, C., Aggarwal, N., Cox, S.J., 2004. Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the "carrier" state in sheep. Vaccine 22, 1221–1232. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.024

Biswal, J.K., Ranjan, R., Subramaniam, S., Mohapatra, J.K., Patidar, S., Sharma, M.K., Bertram, M.R., Brito, B., Rodriguez, L.L., Pattnaik, B., Arzt, J., 2019. Genetic and antigenic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in naturally infected cattle and Asian buffalo in India. PLoS One 14, e0214832. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214832

Bittencourt, G., Da, L., Sebastián, C., Nicolás, F., Lorenzi, R., Carracelas, G., 2010. Estudio Sectorial Cadenas cárnica y farmacéutica veterinaria en Uruguay, Proyecto: Políticas regionales de Innovación en el MERCOSUR: obstáculos y oportunidades (No. IDRC: 104958), IDRC-REDES-CEFIR.

Blanco, E., Blanco, E., Garcia-briones, M., Garcia-briones, M., Sanz-parra, A., Sanz-parra, A., Gomes, P., Gomes, P., Oliveira, E.D.E., Oliveira, E.D.E., Valero, M.L.U.Z., Valero, M.L.U.Z., Andreu, D., Andreu, D., Ley, V., Ley, V., Sobrino, F., Sobrino, F., 2001. Identication of T-Cell Epitopes in Nonstructural Proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus. J. Virol. 75, 3164–3174. https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3164

Blanco, E., Cubillos, C., Moreno, N., Bárcena, J., De La Torre, B.G., Andreu, D., Sobrino, F., 2013. B Epitope Multiplicity and B/T Epitope Orientation Influence Immunogenicity of Foot-and-Mouth Disease Peptide Vaccines. Clin. Dev. Immunol. 2013, 1–10. https://doi.org/10.1155/2013/475960

Braun, R.O., Brunner, L., Wyler, K., Auray, G., García-Nicolás, O., Python, S., Zumkehr, B., Gaschen, V., Stoffel, M.H., Collin, N., Barnier-Quer, C., Bruggmann, R., Summerfield, A., 2018. System immunology-based identification of blood transcriptional modules correlating to antibody responses in sheep. npj Vaccines 3. https://doi.org/10.1038/s41541-018-0078-0

Brehm, K.E., Kumar, N., Thulke, H.-H., Haas, B., 2008. High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. Vaccine 26, 1681–1687. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.038

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

Brown, K.K., Parizek, R.E., Stewart, R.C., 1976. Prevention of Clostridial disease in cattle and sheep by vaccination. Vet. Med. small Anim. Clin. 71, 1717–1721.

Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Pega, J., Schammas, J.M., Cardoso, N., Capozzo, A.V., Perez-Filgueira, M., 2015. Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN-γ responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. Virology 476, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.023

Budhia, S., Haring, L.F., McConnell, I., Blacklaws, B.A., 2006. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. J. Immunol. Methods 309, 160–172. https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.12.006

Carr, B. V., Lefevre, E.A., Windsor, M.A., Inghese, C., Gubbins, S., Prentice, H., Juleff, N.D., Charleston, B., 2013. CD4+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. J. Gen. Virol. 94, 97–107. https://doi.org/10.1099/vir.0.045732-0

Castillo-Velázquez, U., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., Tamez-Guerra, P., Rodríguez-Padilla, C., 2013. Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to Mycobacterium bovis after classical and alternative activation. Vet. Immunol. Immunopathol. 154, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.010

Cerviño, M., Figueras, L., Martín, S., Elvira, L., Callus, M., Dowlut, S., Engelhard, I., Calvo, E., Makoschey, B., 2011. Specific humoral response and effect on rectal temperature of two clostridial

vaccines in lambs. Vet. Rec. https://doi.org/10.1136/vr.c6865

Cesar, D., 2010. Enfermedades Clostridiales. Rev. del Plan Agropecu. 135, 48–52.

CFR, 2019. eCFR — Code of Federal Regulations [WWW Document]. Off. Fed. Regist. Natl. Arch. Rec. Adm. URL https://www.ecfr.gov/cgi-bin/ECFR?page=browse (accessed 11.5.19).

Chandler, H.M., 1975. Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic, and protective antigens of a highly protective strain of Clostridium chauvoei. Infect. Immun. 12, 143–147.

Childerstone, A.J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M., Michael, R., Parkhouse, E., 1999. Demonstration of bovine CD8+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 80, 663–669.

CIU, 2018. Comercio Exterior de Bienes del Uruguay (No. Año 9-Nº 99-Abril 2018), Cámara de Industrias del Uruguay.

Collen, T., Doel, T.R., 1990. Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. J. Gen. Virol. 71, 309–315. https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-2-309

Cotugno, N., Ruggiero, A., Santilli, V., Manno, E.C., Rocca, S., Zicari, S., Amodio, D., Colucci, M., Rossi, P., Levy, O., Martinon-Torres, F., Pollard, A.J., Palma, P., Diotti, R.A., 2019. OMIC Technologies and Vaccine Development: From the Identification of Vulnerable Individuals to the Formulation of Invulnerable Vaccines. J. Immunol. Res. 2019, 1–10. https://doi.org/10.1155/2019/8732191

Crichton, R., Harris, D.A., McKay, D.J., 1986. Standards for Clostridium chauvoei vaccine—The relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent C. chauvoei. Aust. Vet. J. 63, 68–70. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02931.x

Damsgaard, C.T., Lauritzen, L., Calder, P.C., Kjær, T.M.R., Frøkiær, H., 2009. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - A comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. J. Immunol. Methods 340, 95–101. https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.10.005

Dar, P.A., Hajam, I.A., Suryanarayana, V.S., Kishore, S., Kondabattula, G., 2015. Kinetics of cytokine expression in bovine PBMCs and whole blood after in vitro stimulation with foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. Cytokine 72, 58–62.

De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., Igot, D., Baudrihaye, M., Delacroix, D., Franchimont, P., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-2, IFN-γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. Cytokine 4, 239–248. https://doi.org/10.1016/1043-4666(92)90062-V

de los Santos, T., Diaz-San Segundo, F., Rodriguez, L.L., 2018. The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease. Curr. Opin. Virol. 29, 16–25. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.02.005

de Oliveira Júnior, C.A., Duarte, M.C., Antunes de Assis, R., Alves, G.G., Silva, R.O.S., Faria Lobato, F.C., 2019. Humoral responses in cattle to commercial vaccines containing Clostridium perfringens epsilon toxoid and C. botulinum types C and D toxoids last less than a-year. Anaerobe 59, 72–75. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.05.011

Deenadayalan, A., Maddineni, P., Raja, A., 2013. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. BMC Res. Notes 6, 1–5. https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-120

Devera, T.S., Lang, G.A., Lanis, J.M., Rampuria, P., Gilmore, C.L., James, J.A., Ballard, J.D., Lang, M.L., 2015. Memory B cells encode neutralizing antibody specific for toxin B from the Clostridium difficile strains VPI 10463 and NAP1/BI/027 but with superior neutralization of VPI 10463 toxin B. Infect. Immun. 84, 194–204. https://doi.org/10.1128/IAI.00011-15

Diaz-San Segundo, F., Moraes, M.P., Los, T. De, Dias, C.C.A., Grubman, M.J., Segundo, F.D., Moraes, M.P., Santos, T.D.L., 2010. Interferon-Induced Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Infection Correlates with Enhanced Tissue-Specific Innate Immune Cell Infiltration and Interferon-Stimulated Gene Expression Interferon-Induced Protection against Foot-and-Mouth Disease Vi. J. Virol. 84, 2063–2077.

Díaz-San Segundo, F., Rodríguez-Calvo, T., de Avila, A., Sevilla, N., 2009. Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10. PLoS One 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005659

Diethelm-Okita, B.M., Okita, D.K., Banaszak, L., Conti-Fine, B.M., 2000. Universal Epitopes for Human CD4 + Cells on Tetanus and Diphtheria Toxins . J. Infect. Dis. 181, 1001–1009. https://doi.org/10.1086/315324

Ding, G., Bai, J., Feng, B., Wang, L., Qiao, X., Zhou, H., Jiang, Y., Cui, W., Tang, L., Li, Y., Xu, Y., 2019. An EGFP-marked recombinant lactobacillus oral tetravalent vaccine constitutively expressing α, ε, β1, and β2 toxoids for Clostridium perfringens elicits effective anti-toxins protective immunity . Virulence 10, 754–767. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1653720

Doel, T.R., 1996. Natural and vaccine-induced immunity to foot and mouth disease: the prospects for improved vaccines. Rev. Sci. Tech. 15, 883–911. https://doi.org/10.20506/rst.15.3.955

Duque, G.A., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. Front. Immunol. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491

Eblé, P.L., De Bruin, M.G.M., Bouma, A., Van Hemert-Kluitenberg, F., Dekker, A., 2006. Comparison of immune responses after intratypic heterologous and homologous vaccination against foot-and-mouth disease virus infection in pigs. Vaccine 24, 1274–1281. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.040

Ehrenberg, P.K., Shangguan, S., Issac, B., Alter, G., Geretz, A., Izumi, T., Bryant, C., Eller, M.A., Wegmann, F., Apps, R., Creegan, M., Bolton, D.L., Sekaly, R.P., Robb, M.L., Gramzinski, R.A., Pau, M.G., Schuitemaker, H., Barouch, D.H., Michael, N.L., Thomas, R., 2019. A vaccine-induced gene expression signature correlates with protection against SIV and HIV in multiple trials. Sci. Transl. Med. 11, 4236. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw4236

El-Sayed, E., Mossad, W., Ali, S.M., Shawky, M., 2012. Studies on the duration of immunity induced in cattle after natural FMD infection and post vaccination with bivalent oil vaccine. Vet. World 5, 603–608. https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.603-608

Eschbaumer, M., Stenfeldt, C., Rekant, S.I., Pacheco, J.M., Hartwig, E.J., Smoliga, G.R., Kenney, M.A., Golde, W.T., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2016. Systemic immune response and virus persistence after foot-and-mouth disease virus infection of naïve cattle and cattle vaccinated with a homologous adenovirus-vectored vaccine. BMC Vet. Res. 12, 1–18. https://doi.org/10.1186/s12917-016-0838-x

Fach, S.J., Meyerholz, D.K., Gallup, J.M., Ackermann, M.R., Lehmkuhl, H.D., Sacco, R.E., 2007. Neonatal ovine pulmonary dendritic cells support bovine respiratory syncytial virus replication with enhanced interleukin (IL)-4 and IL-10 gene transcripts. Viral Immunol. 20, 119–130. https://doi.org/10.1089/vim.2006.0056

Fensterl, V., Chattopadhyay, S., Sen, G.C., 2015. No Love Lost Between Viruses and Interferons. Annu. Rev. Virol. 2, 549–572. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249

Ferreira, M.R.A., Moreira, G.M.S.G., Da Cunha, C.E.P., Mendonça, M., Salvarani, F.M., Moreira, Â.N., Conceição, F.R., 2016. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon toxins of Clostridium perfringens: Production strategies and applications as veterinary vaccines. Toxins (Basel). 8. https://doi.org/10.3390/toxins8110340

Flynn, J.K., Dore, G.J., Hellard, M., Yeung, B., Rawlinson, W.D., White, P.A., Kaldor, J.M., Lloyd, A.R., Ffrench, R.A., Wales, S., 2011. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users on behalf of the ATAHC Study Group. J. Viral Hepat. 18, 549–561. https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01335.x

Frerichs, G.N., Gray, A.K., 1975. The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. Res. Vet. Sci. 18, 70–5.

Gao, X., Ma, Y., Wang, Z., Bai, J., Jia, S., Feng, B., Jiang, Y., Cui, W., Tang, L., Li, Y., Wang, L., Xu, Y., 2019. Oral immunization of mice with a probiotic Lactobacillus casei constitutively expressing the α-toxoid induces protective immunity against Clostridium perfringens α-toxin. Virulence 10, 166–179. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1582975

García-Piñeres, A.J., Hildesheim, A., Dodd, L., Kemp, T.J., Yang, J., Fullmer, B., Harro, C., Lowy, D.R., Lempicki, R.A., Pinto, L.A., 2009. Gene Expression Patterns Induced by HPV-16 L1 Virus-Like Particles in Leukocytes from Vaccine Recipients. J. Immunol. 182, 1706–1729. https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1706

Gerner, W., Carr, B.V., Wiesmüller, K.H., Pfaff, E., Saalmüller, A., Charleston, B., 2007. Identification of a novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitope with immunodominant characteristics in cattle with MHC serotype A31. Vet. Res. 38, 565–572. https://doi.org/10.1051/vetres:2007016

Golde, W.T., Nfon, C.K., Toka, F.N., 2008. Immune evasion during foot-and-mouth disease virus infection of swine. Immunol. Rev. 225, 85–95.

Gonçalves, E., Bonduelle, O., Soria, A., Loulergue, P., Rousseau, A., Cachanado, M., Bonnabau, H., Thiebaut, R., Tchitchek, N., Behillil, S., van der Werf, S., Vogt, A., Simon, T., Launay, O., Combadière, B., 2019. Innate gene signature distinguishes humoral versus cytotoxic responses to influenza vaccination. J. Clin. Invest. 129, 1960–1971. https://doi.org/10.1172/JCI125372

Goris, N., Maradei, E., D'aloia, R., Fondevila, N., Mattion, N., Perez, A., Smitsaart, E., Nauwynck, H.J., Torre, J. La, Palma, E., De Clercq, K., 2008. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: Precision of the "Protection against Podal Generalisation" test. Vaccine 26, 3432–3437. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.034

Grand View Research, 2019. Animal Vaccines Market Size, Share | Global Industry Report, 2026 (No. GVR-2-68038-053-8), Grand View Research. San Francisco, USA.

Grant, C.F.J., Carr, B.V., Singanallur, N.B., Morris, J., Gubbins, S., Hudelet, P., Ilott, M., Charreyre, C., Vosloo, W., Charleston, B., 2016. The B-cell response to foot-and-mouth-disease virus in cattle following vaccination and live-virus challenge. J. Gen. Virol. 97, 2201–2209. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000517

Green, D.S., Green, M.J., Hillyer, M.H., Morgan, K.L., 1987. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. Vet. Rec. 120, 435–439. https://doi.org/10.1136/vr.120.18.435

Grubman, M., Baxt, B., 2004. Foot-and-mouth disease. Clin. Microbiol. Rev. 17, 465–493.

Grubman, M.J., Moraes, M.P., Diaz-San Segundo, F., Pena, L., de los Santos, T., 2008. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53, 8–17. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00409.x

Guerra-Maupome, M., Slate, J.R., McGill, J.L., 2019. Gamma Delta T Cell Function in Ruminants. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 35, 453–469. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.08.001

Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A.L., Cubillos-Zapata, C., Charleston, B., 2014. Bovine γδ T Cells Are a Major Regulatory T Cell Subset. J. Immunol. 193, 208–222. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303398

Guzman, E., Taylor, G., Charleston, B., Skinner, M.A., Ellis, S.A., 2008. An MHC-restricted CD8+ T-cell response is induced in cattle by foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection and also following vaccination with inactivated FMDV. J. Gen. Virol. 89, 667–675. https://doi.org/10.1099/vir.0.83417-0

Habiela, M., Seago, J., Perez-Martin, E., Waters, R., Windsor, M., Salguero, F.J., Wood, J., Charleston, B., Juleff, N., 2014. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. J. Gen. Virol. 95, 2329–2345. https://doi.org/10.1099/vir.0.068270-0

Han, L., Xin, X., Wang, H., Li, J., Hao, Y., Wang, M., Zheng, C., Shen, C., 2018. Cellular response to persistent foot-and-mouth disease virus infection is linked to specific types of alterations in the host cell transcriptome. Sci. Rep. 8, 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23478-0

Haralambieva, I.H., Zimmermann, M.T., Ovsyannikova, I.G., Grill, D.E., Oberg, A.L., Kennedy, R.B., Poland, G.A., 2016. Whole Transcriptome Profiling Identifies CD93 and Other Plasma Cell Survival Factor Genes Associated with Measles-Specific Antibody Response after Vaccination. PLoS One 11, e0160970. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160970

Harrington, N.P., Surujballi, O.P., Waters, W.R., Prescott, J.F., 2007. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-PCR assay for quantification of gamma interferon mRNA to diagnose tuberculosis in multiple animal species. Clin. Vaccine Immunol. 14, 1563–1571.

Hartmann, S.B., Emnéus, J., Wolff, A., Jungersen, G., 2016. Revisiting the IFN-γ release assay: Whole blood or PBMC cultures? - And other factors of influence. J. Immunol. Methods 434, 24–31. https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.04.003

Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., Sinha, B., 2003. Staphylococcus aureus α-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: Role of endogenous tumour necrosis factor-α and the mitochondrial death pathway. Cell. Microbiol. 5, 729–741. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00317.x

Hussen, J., Schuberth, H.J., 2017. Heterogeneity of bovine peripheral blood monocytes. Front. Immunol. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01875

Hüsser, L., Alves, M.P., Ruggli, N., Summerfield, A., 2011. Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. Virus Res. 159, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.005

Izreli, S., Pfleiderer, C., Lion, T., 1991. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. Nucleic Acids Res. 19, 6051.

Jayeshbhai, C., Hajam, I.A., Kumar Verma, A., Bhanuprakash, V., Kondabattula, G., Kishore, S., 2018. Chemokine CCL20 plasmid improves protective efficacy of the Montanide ISA TM 206 adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in mice model. Vaccine 36, 5318–5324. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.003

Jenvey, C.J., Shircliff, A.L., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., 2019. Phenotypes of macrophages present in the intestine are impacted by stage of disease in cattle naturally infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. PLoS One 14, 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217649

Johnson, S., 1997. Antibody Responses to Clostridial Infection in Humans. Clin. Infect. Dis. 25, S173–S177. https://doi.org/10.1086/516220

Jorge, S., Dellagostin, O.A., 2017. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. Biotechnol. Res. Innov. 1, 6–13. https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001

Jouneau, L., Lefebvre, D.J., Costa, F., Romey, A., Blaise-Boisseau, S., Relmy, A., Jaszczyszyn, Y., Dard-Dascot, C., Déjean, S., Versillé, N., Guitton, E., Hudelet, P., Curet, M., De Clercq, K., Bakkali-Kassimi, L., Zientara, S., Klonjkowski, B., Schwartz-Cornil, I., 2020. The antibody response induced FMDV vaccines in sheep correlates with early transcriptomic responses in blood. NPJ Vaccines 5, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41541-019-0151-3

Juleff, N., Windsor, M., Lefevre, E.A., Gubbins, S., Hamblin, P., Reid, E., McLaughlin, K., Beverley, P.C.L., Morrison, I.W., Charleston, B., 2009. Foot-and-Mouth Disease Virus Can Induce a Specific and Rapid CD4+ T-Cell-Independent Neutralizing and Isotype Class-Switched Antibody Response in Naive Cattle. J. Virol. 83, 3626–3636. https://doi.org/10.1128/JVI.02613-08

Juleff, N., Windsor, M., Reid, E., Seago, J., Zhang, Z., Monaghan, P., Morrison, I.W., Charleston, B., 2008. Foot-and-mouth disease virus persists in the light zone of germinal centres. PLoS One 3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003434

Kabelitz, D., 2011. gdT-cells: Cross-talk between innate and adaptive immunity. Cell. Mol. Life Sci. 68, 2331–2333. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0696-4

Kerry, J.B., Craig, G.R., 1979. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. Vet. Rec. 105, 551–4.

Knight-Jones, T.J.D., Edmond, K., Gubbins, S., Paton, D.J., 2014. Veterinary and human vaccine evaluation methods. Proceddings R. Soc. B 281, 1–10. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2839

Knight-Jones, T.J.D., Robinson, L., Charleston, B., Rodriguez, L.L., Gay, C.G., Sumption, K.J., Vosloo, W., 2016a. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 1 - Overview of Global Status and Research Needs. Transbound. Emerg. Dis. 63, 3–13.

Knight-Jones, T.J.D., Robinson, L., Charleston, B., Rodriguez, L.L., Gay, C.G., Sumption, K.J., Vosloo, W., 2016b. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 2 - Epidemiology, Wildlife and Economics. Transbound. Emerg. Dis. 63, 14–29. https://doi.org/10.1111/tbed.12522

Langellotti, C., Cesar, G., Soria, I., Quattrocchi, V., Jancic, C., Zamorano, P., Vermeulen, M., 2015. Foot-and-mouth disease virus infection of dendritic cells triggers phosphorylation of ERK1/2 inducing class I presentation and apoptosis. Vaccine 33, 4945–4953. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.038

Langellotti, C., Quattrocchi, V., Alvarez, C., Ostrowski, M., Gnazzo, V., Zamorano, P., Vermeulen, M., 2012. Foot-and-mouth disease virus causes a decrease in spleen dendritic cells and the early release of IFN-α in the plasma of mice. Differences between infectious and inactivated virus. Antiviral Res. 94, 62–71. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.009

Lannes, N., Python, S., Summerfield, A., 2012. Interplay of foot-and-mouth disease virus, antibodies and plasmacytoid dendritic cells: Virus opsonization under non-neutralizing conditions results in enhanced interferon-alpha responses. Vet. Res. 43, 1.

Lawrence, P., Rieder, E., 2017. Insights into Jumonji C-domain containing protein 6 (JMJD6): a multifactorial role in foot-and-mouth disease virus replication in cells. Virus Genes 53, 340–351.

https://doi.org/10.1007/s11262-017-1449-8

Lei, Y., Shao, J., Zhao, F., Li, Y., Lei, C., Ma, F., Chang, H., Zhang, Y., 2019. Artificially designed hepatitis B virus core particles composed of multiple epitopes of type A and O foot-and-mouth disease virus as a bivalent vaccine candidate. J. Med. Virol. 91, 2142–2152. https://doi.org/10.1002/jmv.25554

Lewinsohn, D.A., Lewinsohn, D.M., Scriba, T.J., 2017. Polyfunctional CD4+ T cells as targets for tuberculosis vaccination. Front. Immunol. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01262

Lewis, C.J., 2011. Control of Important Clostridial Diseases of Sheep. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 27, 121–126. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.10.009

Li, S., Rouphael, N., Duraisingham, S., Romero-Steiner, S., Presnell, S., Davis, C., Schmidt, D.S., Johnson, S.E., Milton, A., Rajam, G., Kasturi, S., Carlone, G.M., Quinn, C., Chaussabel, D., Palucka, A.K., Mulligan, M.J., Ahmed, R., Stephens, D.S., Nakaya, H.I., Pulendran, B., 2014. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. Nat. Immunol. 15, 195–204. https://doi.org/10.1038/ni.2789

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 25, 402–408.

Lu, Y., Sarson, A.J., Gong, J., Zhou, H., Zhu, W., Kang, Z., Yu, H., Sharif, S., Han, Y., 2009. Expression profiles of genes in toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with Clostridium perfringens. Clin. Vaccine Immunol. 16, 1639–1647. https://doi.org/10.1128/CVI.00254-09

Lv, J., Ding, Y., Liu, X., Pan, L., Zhang, Z., Zhou, P., Zhang, Y., Hu, Y., 2018. Gene expression analysis of porcine whole blood cells infected with foot-and-mouth disease virus using high-throughput sequencing technology. PLoS One 13, e0200081. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200081

Mahapatra, M., Parida, S., 2018. Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. Expert Rev. Vaccines 17, 577–591. https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1492378

Maradei, E., La Torre, J., Robiolo, B., Esteves, J., Seki, C., Pedemonte, A., Iglesias, M., D'Aloia, R., Mattion, N., 2008. Updating of the correlation between lpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphtovirus vaccines in Argentina. Vaccine 26, 6577–6586. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.033

Maradei, E., Perez Beascoechea, C., Malirat, V., Salgado, G., Seki, C., Pedemonte, A., Bonastre, P., D'Aloia, R., La Torre, J.L., Mattion, N., Rodríguez Toledo, J., Bergmann, I.E., 2011. Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009-2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. Vaccine 29, 8230–8240. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.120

McCullough, K.C., Bruckner, L., Schaffner, R., Fraefel, W., Müller, H.K., Kihm, U., 1992. Relationship between the anti-FMD virus antibody reaction as measured by different assays, and protection in vivo against challenge infection. Vet. Microbiol. 30, 99–112. https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90106-4

Mcgill, J.L., Sacco, R.E., Baldwin, C.L., Telfer, J.C., Palmer, M. V, Waters, W.R., 2014. The role of gamma delta T cells in immunity to Mycobacterium bovis infection in cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 159, 133–143. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.010

Mcvey, D.S., Shi, J., 2010. Vaccination Strategies for Emerging Disease Epidemics of Livestock. Vet. Clin. NA Food Anim. Pract. 26, 173–183. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.004

Meade, Kieran G, Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., O'farrelly, C., Costello, E., Keane, J., Zhao, Y., Machugh, D.E., 2007. Innate gene repression associated with Mycobacterium bovis infection in cattle: toward a gene signature of disease. BMC Genomics 8, 1–15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-400

Meade, Kieran G., Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., O'Farrelly, C., Costello, E., Keane, J., Zhao, Y., MacHugh, D.E., 2007. Innate gene repression associated with Mycobacterium bovis infection in cattle: Toward a gene signature of disease. BMC Genomics 8, 1–15.

Medina, G.N., Segundo, F.D.-S., Stenfeldt, C., Arzt, J., de los Santos, T., 2018. The Different Tactics of Foot-and-Mouth Disease Virus to Evade Innate Immunity. Front. Microbiol. 9, 1–22.

Moraes, M.P., de los Santos, T., Koster, M., Turecek, T., Wang, H., Andreyev, V.G., Grubman, M.J., 2007. Enhanced Antiviral Activity against Foot-and-Mouth Disease Virus by a Combination of Type I

and II Porcine Interferons. J. Virol. 81, 7124–7135. https://doi.org/10.1128/JVI.02775-06

Murphy, K., Weaver, C., 2017. Janeway ' S Immunology. Garland Science, Taylor & Francis Group, United State.

Nakaya, H.I., Pulendran, B., 2015. Vaccinology in the era of high-throughput biology. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 370, 20140146. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0146

Nicholson, P., Furrer, J., Hässig, M., Strauss, C., Heller, M., Braga-Lagache, S., Frey, J., 2019. Production of neutralizing antibodies against the secreted Clostridium chauvoei toxin A (CctA) upon blackleg vaccination. Anaerobe 56, 78–87. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.02.011

O'Brien, D.K., Melville, S.B., 2000. The anaerobic pathogen Clostridium perfringens can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. Cell. Microbiol. 2, 505–519. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00074.x

O'Donnell, V., Pacheco, J.M., Gregg, D., Baxt, B., 2009. Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Integrin Receptor Expression in Tissues from Naïve and Infected Cattle. J. Comp. Pathol. 141, 98–112. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.09.008

Oh, Y., Charleston, B., Paton, D.J., Park, J.-H., Barnett, P. V, Joo, Y.-S., Parida, S., 2006. Importance of cell mediated immunity for protection against Foot and Mouth Disease, in: EUFMD (Ed.), Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of EuFMD. Paphos, Cyprus, pp. 230–239.

Oh, Y., Fleming, L., Statham, B., Hamblin, P., Barnett, P., Paton, D.J., Park, J.H., Joo, Y.S., Parida, S., 2012. Interferon-γ Induced by In Vitro Re-Stimulation of CD4+ T-Cells Correlates with In Vivo FMD Vaccine Induced Protection of Cattle against Disease and Persistent Infection. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044365

OIE, 2019. Resolution No. 15 (87th General Session of World Assembly), World Organisation for Animal Health.

OIE, 2018a. Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus), in: OIE - World Organisation for Animal Health (Ed.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE - World Organisation for Animal Health, pp. 433–464.

OIE, 2018b. Principles of veterinay vaccine production, in: OIE - World Organisation for Animal HealthWorld Organisation for Animal (Ed.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE - World Organisation for Animal Health, pp. 94–108.

OIE, 2012. Mycobacterium Bovis Antibody Test Kit (No. IDRC: 104958), World Organisation for Animal Health.

Ostrowski, M., Vermeulen, M., Zabal, O., Geffner, J.R., Sadir, A.M., Lopez, O.J., 2005. Dendritic Cells Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. J. Immunol. 175, 3971–3979.

Ostrowski, M., Vermeulen, M., Zabal, O., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Geffner, J.R., Lopez, O.J., 2007. The Early Protective Thymus-Independent Antibody Response to Foot-and-Mouth Disease Virus Is Mediated by Splenic CD9+ B Lymphocytes. J. Virol. 81, 9357–9367. https://doi.org/10.1128/jvi.00677-07

Outteridge, P.M., 1993. High and low responsiveness to vaccines in farm Animals. Immunol. Cell Biol. 71, 355–366. https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.1993.tb03424.x

Pacheco, J.M., Smoliga, G.R., O'Donnell, V., Brito, B.P., Stenfeldt, C., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2015. Persistent foot-and-mouth disease virus infection in the nasopharynx of cattle; tissue-specific distribution and local cytokine expression. PLoS One 10, 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125698

PANAFTOSA, 2002. Requisitos para acreditación de sistemas nacionales oficiales para el control de calidad de la Vacuna Anti-Aftosa, Centro Pananamericano de Fiebre Aftosa.

Pandya, M., Rasmussen, M., Hansen, A., Nielsen, M., Buus, S., Golde, W., Barlow, J., 2015. A modern approach for epitope prediction: identification of foot-and-mouth disease virus peptides binding bovine leukocyte antigen (BoLA) class I molecules. Immunogenetics 67, 691–703. https://doi.org/10.1007/s00251-015-0877-7

Paredes-Sabja, D., Cofre-Araneda, G., Brito-Silva, C., Pizarro-Guajardo, M., Sarker, M.R., 2012. Clostridium difficile spore-macrophage interactions: Spore survival. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043635

Parida, S., 2009. Vaccination against foot and mouth disease: strategies and effeectiveness. Expert Rev. Vaccines 8, 347–365.

Parida, S., Anderson, J., Cox, S.J., Barnett, P. V., Paton, D.J., 2006a. Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. Vaccine 24, 1107–1116. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.006

Parida, S., Oh, Y., Reid, S.M., Cox, S.J., Statham, R.J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P. V., Charleston, B., Paton, D.J., 2006b. Interferon-γ production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. Vaccine 24, 964–969.

Park, M.E., Lee, S.Y., Kim, R.H., Ko, M.K., Park, J.N., Lee, K.N., Kim, S.M., Choi, J.H., You, S.H., Kim, B., Lee, J.S., Park, J.H., 2016. Altered adjuvant of foot-and-mouth disease vaccine improves immune response and protection from virus challenge. Trials Vaccinol. 5, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.trivac.2016.04.006

Park, S.S., Lillehoj, H.S., Allen, P.C., Park, D.W., FitzCoy, S., Bautista, D.A., Lillehoj, E.P., 2008. Immunopathology and Cytokine Responses in Broiler Chickens Coinfected with Eimeria maxima and Clostridium perfringens with the Use of an Animal Model of Necrotic Enteritis. Avian Dis. 52, 14–22. https://doi.org/10.1637/7997-041707-reg

Patch, J.R., Dar, P.A., Waters, R., Toka, F.N., Barrera, J., Schutta, C., Kondabattula, G., Golde, W.T., 2014. Infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) induces a natural killer (NK) cell response in cattle that is lacking following vaccination. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 37, 249–257.

Patch, J.R., Kenney, M., Pacheco, J.M., Grubman, M.J., Golde, W.T., 2013. Characterization of Cytotoxic T Lymphocyte Function After Foot-and-Mouth Disease Virus Infection and Vaccination. Viral Immunol. 26, 239–249. https://doi.org/10.1089/vim.2013.0011

Péchiné, S., Collignon, A., 2016. Immune responses induced by Clostridium difficile. Anaerobe 41, 68–78. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.014

Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J.M., Malacari, D., Capozzo, A. V., Arzt, J., Perez-Beascoechea, C., Maradei, E., Rodriguez, L.L., Borca, M. V., Perez-Filgueira, M., 2013. Early Adaptive Immune Responses in the Respiratory Tract of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle. J. Virol. 87, 2489–2495. https://doi.org/10.1128/JVI.02879-12

Pega, J., Di Giacomo, S., Bucafusco, D., Schammas, J.M., Malacari, D., Barrionuevo, F., Capozzo, A. V., Rodríguez, L.L., Borca, M. V., Pérez-Filgueira, M., 2015. Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection. J. Virol. 89, 9581–9590.

Perez-Martin, E., Weiss, M., Diaz-San Segundo, F., Pacheco, J.M., Arzt, J., Grubman, M.J., de los Santos, T., 2012. Bovine Type III Interferon Significantly Delays and Reduces the Severity of Foot-and-Mouth Disease in Cattle. J. Virol. 86, 4477–4487. https://doi.org/10.1128/jvi.06683-11

Pezeshki, A., Ovsyannikova, I.G., Mckinney, B.A., Poland, G.A., Kennedy, R.B., Kennedy, R., 2019. The Role of Systems Biology Approaches in Determining Molecular Signatures for the Development of More Effective Vaccines. Expert Rev Vaccines 18, 253–267. https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1575208

Ph. Eur., 2019. European Pharmacopoeia Online 9.7 [WWW Document]. Counc. Eur. - EDQM. URL http://online6.edqm.eu/ep907/# (accessed 11.5.19).

Pires, P.S., Santos, R.L., da Paixão, T.A., de Oliveira Bernardes, L.C., de Macêdo, A.A., Gonçalves, L.A., de Oliveira Júnior, C.A., Silva, R.O.S., Lobato, F.C.F., 2017. Intracellular survival of Clostridium chauvoei in bovine macrophages. Vet. Microbiol. 199, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.027

Plotkin, S.A., 2013. Complex correlates of protection after vaccination. Clin. Infect. Dis. 56, 1458–1465. https://doi.org/10.1093/cid/cit048

Plotkin, S.A., Gilbert, P.B., 2012. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. Clin. Infect. Dis. 54, 1615–1617. https://doi.org/10.1093/cid/cis238

Plotkin, S.L., Plotkin, S.A., 2012. A short history of vaccination, Sixth Edit. ed, Vaccines: Sixth Edition. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00017-3

Popoff, M.R., 2018. Clostridium difficile and Clostridium sordellii toxins, proinflammatory versus anti-inflammatory response. Toxicon 149, 54–64. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.11.003

Popoff, M.R., 2016. Toxins of Histotoxic Clostridia: Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Clostridium novyi, and Clostridium sordelli, in: Uzal, F.A., Songer, J.G., Prescott, J.F., Popoff, M.R. (Eds.), Clostridial Disease of Animals. Wiley Blackwell, pp. 23–44. https://doi.org/10.1016/b978-012595020-6/50012-7

Popoff, M.R., 2014. Pathogenesis and toxins Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.014

Popoff, M.R., Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. Future Microbiol. 4, 1021–1064. https://doi.org/10.2217/FMB.09.72

Presidencia de la República Oriental del Uruguay, 1994. Decreto N° 261/994 [WWW Document]. IMPO. URL https://www.impo.com.uy/bases/decretos/261-1994 (accessed 1.9.20).

Raffatellu, M., Santos, R.L., Chessa, D., Wilson, R.P., Winter, S.E., Rossetti, C.A., Lawhon, S.D., Chu, H., Lau, T., Bevins, C.L., Adams, L.G., Bäumler, A.J., 2007. The capsule encoding the viaB locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with Salmonella enterica serotype typhi. Infect. Immun. 75, 4342–4350.

Reid, E., Juleff, N., Gubbins, S., Prentice, H., Seago, J., Charleston, B., 2011. Bovine Plasmacytoid Dendritic Cells Are the Major Source of Type I Interferon in Response to Foot-and-Mouth Disease Virus In Vitro and In Vivo. J. Virol. 85, 4297–4308. https://doi.org/10.1128/jvi.02495-10

Research and Markets, 2019. Veterinary Vaccines Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 - 2024), Research and Markets. Dublin, Irlanda.

Rivera, M., 2014. Caracterización de la respuesta inmune humoral anti Clostridium chauvoei en bovinos. Universidad de la República.

Robbertse, L., Richards, S.A., Stutzer, C., Olivier, N.A., Leisewitz, A.L., Crafford, J.E., Maritz-Olivier, C., 2020. Temporal analysis of the bovine lymph node transcriptome during cattle tick (Rhipicephalus microplus) infestation. Vaccine 38, 6889–6898. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.060

Robinson, L., Knight-Jones, T.J.D., Charleston, B., Rodriguez, L.L., Gay, C.G., Sumption, K.J., Vosloo, W., 2016. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 6 - Immunology. Transbound. Emerg. Dis. 63, 56–62.

Robinson, L., Windsor, M., McLaughlin, K., Hope, J., Jackson, T., Charleston, B., 2011. Foot-and-mouth disease virus exhibits an altered tropism in the presence of specific immunoglobulins, enabling productive infection and killing of dendritic cells. J. Virol. 85, 2212–23. https://doi.org/10.1128/JVI.02180-10

Robiolo, B., Grigerat, P.R., Periolot, O.H., Sekit, C., Bianchil, T., Maradeiz, E., Torre, J.L. La, 1995. Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina, Vaccine.

Rodriguez, L.L., Grubman, M.J., 2009. Foot and mouth disease virus vaccines. Vaccine 27, 90–94.

Rodríguez Pulido, M., Sáiz, M., 2017. Molecular Mechanisms of Foot-and-Mouth Disease Virus Targeting the Host Antiviral Response. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 252.

Rojas, J.M., Avia, M., Martín, V., Sevilla, N., 2017. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. J. Immunol. Res. 2017, 1–15. https://doi.org/10.1155/2017/6104054

Rood, J.I., McClane, B.A., Songer, J.G., Titball, R.W., 1997. The clostridia: molecular biology and pathogenesis - Monash University. Academic Press, London UK.

Roth, J.A., 2011. Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. Procedia Vaccinol. 5, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.009

Sahay, B., Colliou, N., Zadeh, M., Ge, Y., Gong, M., Owen, J.L., Valletti, M., Jobin, C., Mohamadzadeh, M., 2018. Dual-route targeted vaccine protects efficiently against botulinum neurotoxin A complex. Vaccine 36, 155–164. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.008

Sánchez López, A.D., Flores Villalva, S., Gutiérrez Pabello, J.Á., 2018. Mycobacterium bovis induce una respuesta inmune celular heterogénea en bovinos infectados naturalmente. Rev. Mex. Ciencias Pecu. 9, 171–183. https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4320

Sarkander, J., Hojyo, S., Tokoyoda, K., 2016. Vaccination to gain humoral immune memory. Clin. Transl. Immunol. 5, e120. https://doi.org/10.1038/cti.2016.81

Schmautz, C., Hillreiner, M., Ballweg, I., Pfaffl, M.W., Kliem, H., 2018a. Stimulated enrichment of

clostridium difficile specific IgA in mature cow's milk. PLoS One 13, 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195275

Schmautz, C., Müller, N., Auer, M., Ballweg, I., Pfaffl, M.W., Kliem, H., 2018b. Immune cell counts and signaling in body fluids of cows vaccinated against Clostridium difficile. J. Biol. Res. 25, 1–22. https://doi.org/10.1186/s40709-018-0092-4

Sei, J.J., Waters, R.A., Kenney, M., Barlow, J.W., Golde, W.T., 2016. Effect of Foot-and-Mouth Disease Virus Infection on the Frequency, Phenotype and Function of Circulating Dendritic Cells in Cattle. PLoS One 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152192

SENASA, 2006. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Argentina (SENASA). Resolución Nº 351/2006 - Boletin Oficial Nº 30.940 -5/7/06 [WWW Document]. Serv. Nac. Sanid. y Calid. Agroaliment. Argentina. URL http://www.loa.org.ar/legNormaDetalle.aspx?id=11143

SENASA, 1995. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria Argentina (SENASA). Resolucion Nº 219/1995 [WWW Document]. Serv. Nac. Sanid. y Calid. Agroaliment. URL http://digesto.senasa.gob.ar/digestosenasa.nsf/73ba8977fd5066ae0325782a00004064/56eccde31a3a65a303257e49005427ed/$FILE/RZ-219-1995.doc

Sharma, M., Krammer, F., García-Sastre, A., Tripathi, S., 2019. Moving from empirical to rational vaccine design in the 'Omics' era. Vaccines 7, 1–10. https://doi.org/10.3390/vaccines7030089

Shi, H., Huang, X., Yan, Z., Yang, Q., Wang, P., Li, S., Sun, W., Gun, S., 2019. Effect of Clostridium perfringens type C on TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in piglet small intestines. Microb. Pathog. 135, 103567. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103567

Siegrist, C.A., 2012. Vaccine immunology, Sixth Edit. ed, Vaccines: Sixth Edition. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00004-5

Snoeck, M., Casacuberta, C., Domingo, R., Pastori, H., Pittaluga, L., 2007. The emergence of new successful export activities in Uruguay, Universidad de la República, Uruguay.

Sobrino, F., Margarita, S., Jim, M., Jose, N., Baranowski, E., Ley, V., Sobrino, F., Margarita, S., Jim, M., Jose, N., Aranowskia, E.B., Eyb, V.L., 2001. Foot-and-mouth disease virus : a long known virus, but a current threat. Vet. Res. 32, 1–30.

Steinman, A., Galon, N., Arazi, A., Bar-Giora, Y., Shpigel, N.Y., 2007. Cattle immune response to botulinum type D toxoid: Results of a vaccination study. Vaccine. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.051

Stenfeldt, C., Diaz-San Segundo, F., de los Santos, T., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2016a. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs. Front. Vet. Sci. 3, 1–12.

Stenfeldt, C., Eschbaumer, M., Rekant, S.I., Pacheco, J.M., Smoliga, G.R., Hartwig, E.J., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2016b. The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. J. Virol. 90, 6344–6364. https://doi.org/10.1128/jvi.00388-16

Stenfeldt, C., Eschbaumer, M., Smoliga, G.R., Rodriguez, L.L., Zhu, J., Arzt, J., 2017. Clearance of a persistent picornavirus infection is associated with enhanced pro-apoptotic and cellular immune responses. Sci. Rep. 7, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18112-4

Stenfeldt, C., Heegaard, P.M., Stockmarr, A., Tjørnehøj, K., Belsham, G.J., 2011. Analysis of the acute phase responses of Serum Amyloid A, Haptoglobin and Type 1 Interferon in cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus serotype O. Vet. Res. 42, 66. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-66

Stenfeldt, C., Pacheco, J.M., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2014. Early Events in the Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs; Identification of Oropharyngeal Tonsils as Sites of Primary and Sustained Viral Replication. PLoS One 9, e106859. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106859

Stenfeldt, C., Pacheco, J.M., Smoliga, G.R., Bishop, E., Pauszek, S.J., Hartwig, E.J., Rodriguez, L.L., Arzt, J., 2016c. Detection of Foot-and-mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. Transbound. Emerg. Dis. 63, 152–164.

Summerfield, A., Guzylack-Piriou, L., Harwood, L., McCullough, K.C., 2009. Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: Current understanding and future directions. Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 205–210. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.296

Takamatsu, H.H., Denyer, M.S., Stirling, C., Cox, S., Aggarwal, N., Dash, P., Wileman, T.E., Barnett, P.

V., 2006. Porcine γδ T cells: Possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 49–61. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.011

Tanaka, M., Hirayama, N., Tamura, Y., 1987. Production, characterization, and protective effect of monoclonal antibodies to Clostridium chauvoei flagella. Infect. Immun. 55, 1779–1783.

Telfer, J.C., Baldwin, C.L., 2015. Bovine gamma delta T cells and the function of gamma delta T cell specific WC1 co-receptors. Cell. Immunol. 296, 76–86. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.05.003

Thakur, A., Pedersen, L.E., Jungersen, G., 2012. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. Vaccine 30, 4907–4920. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.049

Thay, B., Wai, S.N., Oscarsson, J., 2013. Staphylococcus aureus a-Toxin-Dependent Induction of Host Cell Death by Membrane-Derived Vesicles. PLoS One 8, 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054661

Thomas, L.F., Bellet, C., Rushton, J., 2019. Using economic and social data to improve veterinary vaccine development: Learning lessons from human vaccinology. Vaccine. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.044

Tietze, K., Dalpke, A., Morath, S., Mutters, R., Heeg, K., Nonnenmacher, C., 2006. Differences in innate immune responses upon stimulation with gram-positive and gram-negative bacteria. J. Periodontal Res. 41, 447–454. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00890.x

Toka, F.N., Golde, W.T., 2013. Cell mediated innate responses of cattle and swine are diverse during foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection: A unique landscape of innate immunity. Immunol. Lett. 152, 135–143. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.05.007

Toka, F.N., Kenney, M.A., Golde, W.T., 2011. Rapid and Transient Activation of gd T Cells to IFN-g Production, NK Cell-Like Killing, and Antigen Processing during Acute Virus Infection. J. Immunol. 186, 4853–4861. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003599

Toka, F.N., Nfon, C., Dawson, H., Golde, W.T., 2009a. Natural killer cell dysfunction during acute infection with foot-and-mouth disease virus. Clin. Vaccine Immunol. 16, 1738–1749. https://doi.org/10.1128/CVI.00280-09

Toka, F.N., Nfon, C.K., Dawson, H., Estes, D.M., Golde, W.T., 2009b. Activation of Porcine Natural Killer Cells and Lysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Infected Cells. J. Interf. Cytokine Res. 29, 179–192.

Toka, F.N., Nfon, C.K., Dawson, H., Golde, W.T., 2009c. Accessory-cell-mediated activation of porcine NK cells by toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR8 agonists. Clin. Vaccine Immunol. 16, 866–878. https://doi.org/10.1128/CVI.00035-09

Torabi Goudarzi, S., Hajivalili, M., Hosseini, M., Ghafari Khamene, M., Yazdani, Y., Sadreddini, S., Miahipour, A., Younesi, V., Yousefi, M., 2016. Tetanus neurotoxin HCC protein commits T cell to IFN-γ producing cells. Cell. Mol. Biol. 62, 20–24. https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.3.5

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2007. Introducción a la microbiología, 9th ed. Editorial Médica Panamericana.

Troxel, T.R., Burke, G.L., Wallace, W.T., Keaton, L.W., Mcpeake, S.R., Smith, D., Nicholson, I., 1997. Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response Clostridial Vaccination Efficacy on Stimulating and Maintaining an Immune Response in Beef Cows and Calves 1,2. J. Anim. Sci. Anim. Sci 75, 19–25.

Useh, N.M., Nok, A.J., Esievo, K.A.N., 2003. Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: The role of toxins and neuraminidase. A short review. Vet. Q. 25, 156–159. https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695158

Uzal, F.A., 2012. Evidence-Based Medicine Concerning Efficacy of Vaccination Against Clostridium chauvoei Infection in Cattle. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.12.006

Uzal, F.A., Bodero, D.A.V., Kelly, W.R., Nielsen, K., 1998. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial Clostridium perfringens epsilon toxoid vaccine. Vet. Rec. 143, 472–474. https://doi.org/10.1136/vr.143.17.472

Valarcher, J., Furze, J., Wyld, S., Cook, R., Conzelmann, K., Taylor, G., 2003. Role of Alpha / Beta Interferons in the Attenuation and Immunogenicity of Recombinant Bovine Respiratory Syncytial Viruses Lacking NS Proteins Role of Alpha / Beta Interferons in the Attenuation and Immunogenicity of Recombinant Bovine Respiratory Syncyti 77, 8426–8439.

VanLierop, M.J.C., Nilsson, P.R., Wagenaar, J.P.A., Van Noort, J.M., Campbell, J.D.M., Glass, E.J., Joosen, 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.

Veritrade.com, 2019. Importaciones y Exportaciones de Vacunas para la medicina veterinaria [WWW Document]. www.veritradecorp.com/. URL https://www.veritradecorp.com/es/uruguay/importaciones-y-exportaciones/vacunas-para-la-medicina-veterinaria/300230 (accessed 11.22.19).

Waheed, U., Gibson, D., Paton, D.J., Khan, Q.M., Parida, S., 2008. Development and evaluation of IgM ELISA for the detection of FMDV specific IgM antibodies in bovine and ovine sera, European Commission for de control of FMDV (EUFMD).

Wallace, F.M., Mach, A.S., Keller, A.M., Lindsay, J.A., 1999. Evidence for Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) inducing a mitogenic and cytokine response in vitro and a cytokine response in vivo. Curr. Microbiol. 38, 96–100. https://doi.org/10.1007/s002849900410

Wang, G., Wang, Y., Shang, Y., Zhang, Z., Liu, X., 2015. How foot-and-mouth disease virus receptor mediates foot-and-mouth disease virus infection. Virol. J. 12, 1–7.

Webster, A.C., Frank, C.L., 1985. Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multi-component clostridial vaccines. Aust. Vet. J. 62, 112–114. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb07254.x

Wilk, M.M., Mills, K.H.G., 2018. CD4 TRM cells following infection and immunization: Implications for more effective vaccine design. Front. Immunol. 9, 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01860

Windsor, M.A., Carr, B.V., Bankowski, B., Gibson, D., Reid, E., Hamblin, P., Gubbins, S., Juleff, N., Charleston, B., 2011. Cattle remain immunocompetent during the acute phase of foot-and-mouth disease virus infection. Vet. Res. 42, 108. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-108

Witchell, J., Maddipatla, S.V.P.K., Wangoo, A., Vordermeier, M., Goyal, M., 2010. Time dependent expression of cytokines in Mycobacterium bovis infected cattle lymph nodes. Vet. Immunol. Immunopathol. 138, 79–84. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.004

Yan, X., Huang, Y., Wang, H., Du, M., Hess, B.W., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., Zhu, M.J., 2011. Maternal obesity induces sustained inflammation in both fetal and offspring large intestine of sheep. Inflamm. Bowel Dis. 17, 1513–1522. https://doi.org/10.1002/ibd.21539

Yang, L., Liu, Z., Li, J., He, K., Kong, L., Guo, R., Liu, W., Gao, Y., Zhong, J., 2018. Association of the expression of Th cytokines with peripheral CD4 and CD8 lymphocyte subsets after vaccination with FMD vaccine in Holstein young sires. Res. Vet. Sci. 119, 79–84. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.017

Yaqoob, P., Newsholme, E.A., 1999. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. Cytokine 11, 600–605. https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0471

Yokota, M., Tatsumi, N., Nathalang, O., Yamada, T., Tsuda, I., 1999. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. J. Clin. Lab. Anal. 13, 133–140.

Zabel, F., Kündig, T.M., Bachmann, M.F., 2013. Virus-induced humoral immunity: On how B cell responses are initiated. Curr. Opin. Virol. 3, 357–362. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.004

Zaragoza, Orellana, Moonen, Moutafis, Marcellin, 2019. Vaccine Production to Protect Animals Against Pathogenic Clostridia. Toxins (Basel). 11, 525. https://doi.org/10.3390/toxins11090525

Zeng, J., Deng, G., Wang, J., Zhou, J., Liu, X., Xie, Q., Wang, Y., 2011. Potential protective immunogenicity of recombinant clostridium perfringens α-β2-β1 fusion toxin in mice, sows and cows. Vaccine 29, 5459–5466. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.059

Zhang, T., Chen, H., Qi, L., Zhang, J., Wu, R., Zhang, Y., Sun, Y., 2018. Transcript Profiling Identifies Early Response Genes against FMDV Infection in PK-15 Cells. Viruses 10, 364. https://doi.org/10.3390/v10070364

Zhang, Z., Ahmed, R., Paton, D., Bashiruddin, J.B., 2009. Cytokine mRNA responses in bovine epithelia during foot-and-mouth disease virus infection. Vet. J. 179, 85–91.

https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.012

Zhang, Z., Bashiruddin, J.B., Doel, C., Horsington, J., Durand, S., Alexandersen, S., 2006. Cytokine and toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. J. Comp. Pathol. 134, 60–66. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.06.011

Zhang, Z.D., Hutching, G., Kitching, P., Alexandersen, S., 2002. The effects of gamma interferon on replication of foot-and-mouth disease virus in persistently infected bovine cells. Arch. Virol. 147, 2157–2167. https://doi.org/10.1007/s00705-002-0867-6

Zhao, F.R., Xie, Y.L., Liu, Z.Z., Shao, J.J., Li, S.F., Zhang, Y.G., Chang, H.Y., 2017. Transcriptomic analysis of porcine PBMCs in response to FMDV infection. Acta Trop. 173, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.009

Zhou, H., Gong, J., Brisbin, J., Yu, H., Sarson, A.J., Si, W., Sharif, S., Han, Y., 2009. Transcriptional profiling analysis of host response to Clostridium perfringens infection in broilers. Poult. Sci. 88, 1023–1032. https://doi.org/10.3382/ps.2008-00343

Zou, Q., Wu, B., He, X., Zhang, Y., Kang, Y., Jin, J., Xu, H., Liu, H., Wang, B., 2010. Increasing a Robust Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Response by FMDV DNA Vaccination with IL-9 Expressing Construct. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–9. https://doi.org/10.1155/2010/562356

CAPITULO 6:

PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA ASOCIADA A LA TESIS

Publicaciones derivadas de la Tesis:

Temporal evolution of anti-*Clostridium* antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccine (2018). Veterinary Immunology and Immunopathology, 202, 46-51.

Andrea Rossi, Amy Mónaco, Julio Guarnaschelli, Fernando Silveira, Andrés Iriarte, Arndt G. Benecke, José A. Chabalgoity.

Presentaciones Dictadas:

Functional genomics as a tool to define a molecular signature of effective vaccination against foot and mouth disease virus. Presentación oral a cargo del Dr. Chabalgoity en el Congreso Vaccine Technology IV 2014, Albufeira, Portugal.

Andrea Rossi, Juan Martíin Marqués, Marcelo A. Spitteler, Eliana Smitsaart, M. Susana Levy, and José Alejandro Chabalgoity

Presentaciones en Congresos:

Estudios de correlatos inmunológicos asociados a la protección por vacunas policlostridiales en bovinos. Presentación en forma de poster en II congreso Nacional de Biociencias 2019, Montevideo, Uruguay.

Andrea Rossi, Julio Guarnaschelli, María Moreno, Alejandro Chabalgoity.

Manuscritos en Preparación:

Gene expression signature in Peripheral Blood Lymphocytes of Bovine Vaccinated with Foot-and-Mouth Disease Virus.

Andrea Rossi, Juan Martín Marqués, Sebastián Sasias, M. Susana Levb, Andrés Iriarte, Arndt Benecke, José A. Chabalgoity

ANEXOS

ANEXO 1

Secuencias de primers y sondas prediseñadas Taqman utilizadas para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR en bovinos y ovinos

a) Bovinos

Tabla A1. Secuencias de primers utilizados para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR en bovinos. (1): (Harrington et al., 2007), (2): (Kieran G Meade et al., 2007), (3): (Raffatellu et al., 2007), (4): (Valarcher et al., 2003)

Gen	Secuencia Primer Forward (5'-3')	Secuencia Primer Reverse (5'-3')	Producto PCR (pb)
β2M(1)	agacacccaccagaagatgg	tccccattcttcagcaaatc	98
IFN-γ(1)	gcgcaaagccataaatgaac	cttctcttccgctttctgag	78
TNF-α (2)	tctaccagggaggagtcttcca	gtccggcaggttgatctca	68
IL-4(2)	gccacacgtgcttgaacaaa	tgcttgccaagctgttgaga	63
IL-10	accagcctgccccacat	ggtcaacagtaagctgtgcagttg	99
GAPDH	ggcgccaagagggtcat	aggcattgctgacaatcttgag	109
IFN-α(4)	gtgaggaaatacttccacagactcact	tgaggaagagaaggctctcatga	108
IFN-β(4)	cctgtgcctgatttcatcatga	gcaagctgtagctcctggaaag	97
IL-1α	cacctctctctcaatcagaagtcctt	aggtatccagggacataaacttattca	91
IL-2	ccaaggttaacgctacagaattga	attgtccattgaatccttgatctct	131
IL-17(3)	tccatctcacagcgagcacaag	agccaccagactcagaagcagtag	113
CLEC1A	cgatgagcctgcattctcaa	gggacgctggtgctctgtat	74
DNAJA1	ggaccaggtagaattagtggactttg	atcatcctcgtatgcttctccatt	79
RPL9	gccgcatctactgcgagaat	gccgcatctactgcgagaat	90
CREB3	ccctgcatgcaaatctcaca	tgccctgcaagataacagatgt	75
GADD45B	cggccaagctgatgaatgt	cctcgtcgatggccagaa	63
CCL4	cagcaccaatgggctcaga	gaggaatcttccgcagagtgtaa	66
UPP1	agccggaagatcacaatgactt	gggaaatcgtgcgtgctagt	109
SIX5	cgggcactcaacctctctgt	tccccaaatctccccatataga	99
P2RY6	tgcccactgccctctttg	ggcggactcaggtcatagca	70
GPR137B	gtcttctggctgctctactgctt	ggcaaccggtatttgagtaattct	134
GPR128	tttaatccaaggtacaaccgaaca	gcgtgtcccaatccttcatg	88
FTSJ2	tggccgtgcagagagtca	tcagcagggcatagaaacgtt	121
BLA-DQB	gagtggcgggcacagtct	gcgcatgagccccttct	129

EIF5A	gttcgcgcgagttggaa	cgaagccattcttacgtaatgct	123
GBP4	ggaaaggagttaaggcaaacca	gccttgtccccatcagtga	109
CD3G	cttcaaggtactatggcccatgt	tgtctccagaacctatttgttcca	139
KIR3DL2	gagtctcggattctgcgtgagt	acgggagtgacaccgaagag	130
CCNB1	cagctcttggagacatcggtaa	gctaaagtttttgcttccttttca	82
IRF8	acgctgcgctttgaacaag	gccacacctaatttgcatttctg	129
IGJ	ccatctgtctgacctgtgcaaa	tttctgtcataggtgtaacaggtctca	126
THSD4	ccccaaggagccacaaaa	cttcgcaaggccaaatagttg	68
LIF	tgtcccagcaacctcatgaa	cgtgtaatagaggataaagaggctgtt	87
PIGR	cgatgtcgcgcctgttc	ggtagtagcacttgatggacactga	129
CXCL10	gaaagcaattaacaagcaaaggactaa	tctctggtccatccttatcagtagtg	90
CLEC7A	caggagatctgtagtctcagagaaagg	aaatgcccagagtcacagcaa	80
IL-12A	cagcaagcccaggaagga	tctggccttctgtagcgtgtt	80
SLAMF1	cttatcctcactggctgatggat	gtcaagccctcacctgttctg	106
C5AR1	cctgccctctctcatccttct	gcggtcggcgctgat	70
CD180	gcctcggtcctgagaatgg	tgccttctttctcagtgcacttc	115
FCGR1A	gtggctcataatagctctgatcctt	gacccacggaggcttcaag	91
FGF18	cgcccagcgatgtattcag	tgcggaagtccacgttctc	112
S100A9	tcaacatcttccaccagtactctgtac	tcttctgcttcttgagaaagtttgg	114
TG	tgggagcgattatgccattc	cgcgctggaccacaca	115
THBS1	ccgcaaagtgaccgaagag	ctgtactgcactccgttgtggta	84
IL-12B	catcagggacatcatcaaacca	ccacctgccgagaattctttaa	74
CXCR5	gacctgtacaaggaattagggagcta	tgaacacggccttgaagga	115
CD14	acagtccagccgacaacca	gttctgttgtgtccgcagaca	133
MMP9	ttagagagcacggagatgggtatc	agtgggcatctccctgaatg	96
CSF1	tggagacacaaaactcgcaatc	gagttcgagagtcaggacttttga	79
BOLA-DQB	gcgccaagtggaacctaca	ccttgatctggcctggatagaa	110
CD36	tgatatttgcaggtccatctatgc	aacagtggttgtctggattttgaa	128
VCAN	ctatggctggcacaaatttcaa	tggcccacacgattcaca	153
HCK	caagcggtggcctgaca	gcaaccacaatgatatcctcagaa	75
CXCR2	atcagcatggaccgctacct	tgacccagtgccgcttct	70
IL2RA	aagcacctgcatgatgatcaac	gaggctctgcgtcatctgaag	104
GSTA4	tggagccagaaaacctgaaag	cctcgtccgttgggatagtg	68
CCR1	ccatcgtccatgctgtgttt	cgacaatgctggtgatgatacc	69
CXCL5	ctgcgttgtgtgtgtttaacca	ttcaaggtggctatcacttcca	116
IGF2	ggccctgctggagacttactg	gactgcttccagatgtcatattgg	135
IL23R	tgttgatccggtgattacagaga	ccaggcatcctgtattgttttct	83
TNFRSF1A	acccgcaaaatagcaccatt	cctggacccggacagtcat	76
CTBP2	gtctccctgcactgcaatctc	ccttgcctcatctgctttatagtga	77

Tabla A2. Sondas prediseñadas Taqman utilizadas para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR en bovinos. Adquiridas en Thermo Fisher Scientific.

Gen	TaqMan Assay IDs
18s	Hs99999901_s1
il12b	Bt03213923_m1
cd14	Bt03212325_g1
mmp9	Bt03215999_m1
csf1	Bt03212475_m1
bola-dqb	Bt03278798_m1
tap1	Bt03261452_m1
ikbkb	Bt03223486_m1
ifng	Bt03212723_m1
tnf	Bt03259154_m1
cd36	Bt03212335_mH
b2m	Bt03251628_m1
cxcr5	Bt03210332_m1
vcan	Bt03217632_m1
hck	Bt03252048_m1
rps24	Bt03220530_g1
cxcr2	Bt03277120_m1
il2ra	Bt03213930_m1
csf1r	Bt03241191_g1
actb	Bt03279174_g1
stk40	Bt03241924_m1
rpl10	Bt03216173_g1
cdkn3	Bt03229761_m1
gsta4	Bt03219687_m1
gapdh	Bt03210913_g1
ccr1	Bt03278806_m1
cxcl5	Bt03259299_g1
igf2	Bt03259225_m1
il23r	Bt03817887_m1
tnfrsf1a	Bt03215767_g1
eif2b1	Bt03247284_m1
ctbp2	Bt03224431_m1

b) Ovinos

Tabla A3. Secuencias de primers utilizados para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR en ovinos. (1): (Budhia et al., 2006), (2): (Fach et al., 2007), (3): (Yan et al., 2011)

Gen	Secuencia Primer Forward (5'-3')	SecuenciaPrimer Reverse (5'-3')	Producto PCR (pb)
GAPDH(1)	ggcgtgaaccacgagaagtataa	ccctccacgatgccaaagt	118
IFN-γ(1)	ttcttgaacggcagctctgag	tggcgacaggtcattcatca	127
IL-4(1)	tgacattaccttagaagagatcatca	ttctcagttgcgttctttgg	117
IL12 p40(1)	tctcggcaggtggaagtca	tggcgacaggtcattcatca	144
IL1-β(1)	cgaacatgtcttccgtgatg	cgaacatgtcttccgtgatg	143
TNF-α(1)	ggtgcctcagcctcttctc	gaaccagaggcctgttgaag	134
IL-10(2)	gatgccacaggctgagaacc	gcgagttcacgtgctccttg	53
IL-17(3)	tgctactgcttctgagtctggtggc	tgaccctcacatgctgtgggaagtt	111

ANEXO 2

Optimización de técnicas para analizar el perfil de expresión de citoquinas por RT-qPCR

A.2.1 | OPTIMIZACIÓN PARA CITOQUINAS BOVINAS

Las RT-qPCR (transcripción reversa seguida de Real Time PCR) para evaluar el perfil de expresión de citoquinas bovinas fue puesto a punto con el modelo de fiebre aftosa. Posteriormente, las técnicas optimizadas fueron ajustadas y utilizadas para el modelo enfermedades clostridiales. Para esta optimización fue necesario poner a punto los diferentes protocolos que utiliza esta plataforma.

A.2.1.1 | Modelo fiebre aftosa

Se trabajó en los siguientes puntos con la finalidad de optimizar las condiciones:

a) RT-qPCR

El punto de partida, fue optimizar los protocolos para RT-qPCR de manera de contar con una plataforma que nos permitiera definir las mejores condiciones experimentales. Para esto, fue extraído ARN total de muestras de sangre entera de bovinos sanos provenientes del Campo Experimental del Instituto de Higiene. El protocolo optimizado fue detallado en Ítem 2.4 (M&M).

La extracción de ARN fue realizada con TRIzol (Thermo Fisher Scientific) debido a que es un método que permite aislar ARN total de calidad e integridad suficientemente buena como para qPCR, y permite el procesamiento simultáneo de una gran cantidad de muestras. Para utilizar este reactivo con sangre entera, fue necesario incluir un paso previo ya que el TRIzol se recomienda para muestras no líquidas. Para ello, incluimos una lisis de eritrocitos con el buffer EL (QIAGEN) y luego los PBLs fueron homogeneizados con el volumen de TRIzol sugerido por el fabricante.

Por otra parte, evaluamos el rendimiento de la extracción de ARN total a partir de 250, 500 y 1000 µl de sangre. Para las tres condiciones se utilizó una relación 1:1 (vol/vol) de sangre y TRIzol. El ARN purificado fue resuspendido en 15, 20 o 30 µl de H_2O Ultrapure (Invitrogen), respectivamente. De los tres volúmenes evaluados fue posible extraer ARN total con una concentración promedio fue de 250-300 ng/µl, y una calidad adecuada (valores superiores a 1,8 y 1,5 para las relaciones de absorbancia: A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}, respectivamente). Los valores de la relación A_{260}/A_{230} presentaron una mayor variabilidad debido a que se utilizó el TRIzol como método de extracción.

Previo a la RT, el ARN fue tratado con DNasa I (Invitrogen) a tres concentraciones diferentes: 1, 0,7 y 0,4 U/µl. Los resultados observados nos indicaron que el ADN genómico contaminante fue totalmente eliminado con 0,4 U/µl, por lo que se seleccionó como concentración de uso.

En esta etapa, consideramos optimizar las RT-qPCR para citoquinas que, por bibliografía, se reportaba que su expresión génica era modificada en respuesta al virus de la aftosa. En particular, evaluamos las siguientes citoquinas bovinas: IFN-γ, IL-4, IL-17, e IL-10. La expresión de las citoquinas se realizó mediante cuantificación relativa de la expresión de los ARNm normalizado contra un gen de referencia de expresión constitutiva y relativo a la condición sin estimular, aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Como posibles controles endógenos se evaluaron dos genes de expresión constitutiva: β2M y GAPDH. Los primers fueron tomados de la bibliografía (Harrington et al., 2007; Kieran G. Meade et al., 2007; Raffatellu et al., 2007; Valarcher et al., 2003) o diseñados de *novo* a partir de las secuencias de referencia de los genes de interés. Tanto los primers diseñados de *novo* como los obtenidos de la bibliografía, según reporte de sus autores, fueron diseñados con el programa Primer Express Software (Applied Biosystems) y Primer3Plus. Las secuencias de referencia de los genes a evaluar fueron obtenidas en la página web de la Universidad de Santa Cruz (http://genome.ucsc.edu/) o en la base de datos de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). La verificación de los primers fue realizada con en los softwares: Primer-Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y Primer Express Software. Las secuencias de todos los primers se detallaron en el Anexo 1.

A modo de ejemplo, en las figuras A1 y A2 se muestran los resultados de las qPCR optimizadas para los genes β2M e IFN-γ. Ambas qPCR presentan curvas de amplificación con una buena pendiente (gráficos de amplificación ubicados a la izquierda del panel en la Fig. A1-A). Además, las qPCR para β2M e IFN-γ amplifican un único amplicón a una Tm determinada, no presentan dímeros de primers y el control negativo no amplifica (Fig. A1-A). Estos

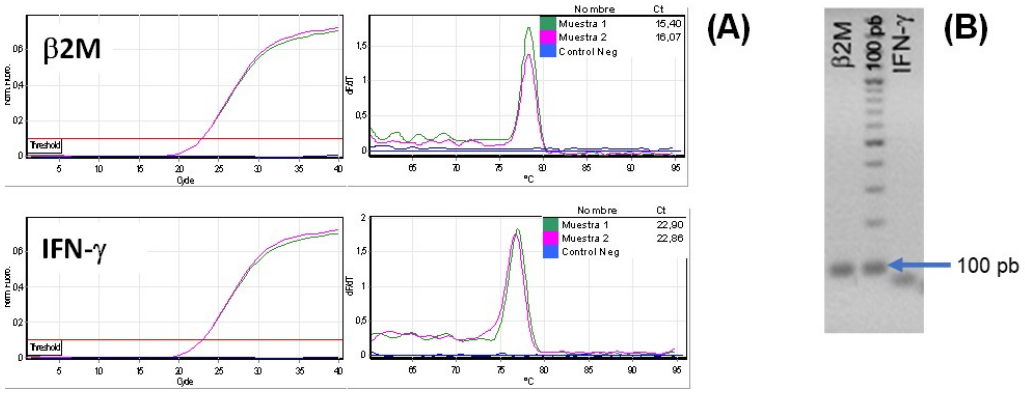

Figura A1. Real time PCR optimizadas para β2M e IFN-γ. En (A) se observan los gráficos de amplificación (a la izquierda) y de disociación (a la derecha), y los valores de Ct para las muestras amplificadas en cada una de las qPCR. En (B): análisis de amplicones para β2M e IFN-γ en un gel de agarosa al 2%: Carril nº 1: amplicón de β2M (98 pb); Carril nº 2: marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); Carril nº 3: amplicón de IFN-γ (78 pb).

amplicones se corresponden a un único producto que presentan el tamaño esperado 98 pb y 78 pb para β2M e IFN-γ, respectivamente (Fig. A1-B).

Para aplicar el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las eficiencias de las qPCR para el gen housekeeping y el gen problema deben ser cercanas al 100% y similares entre sí (Livak and Schmittgen, 2001). Para ello, calculamos la pendiente a partir de los datos, ajustados por regresión lineal, de Ct obtenidos para cada qPCR (β2M e IFN-γ) en cada dilución de ADNc vs el $\log_{10}$ (dilución). Ambas qPCR fueron realizadas con una curva de ADNc de 6 diluciones seriadas al tercio preparada a partir de un pool de tres ADNc (Fig. A2-A). A partir de la pendiente calculamos las eficiencias de las qPCR para β2M e IFN-γ que arrojaron valores de 102% y 99%, respectivamente (Fig. A2-B).

Para verificar que ambas eficiencias fueran similares entre sí, se graficó el ΔCt ($Ct_{\beta 2M}$ - $Ct_{IFN\text{-}\gamma}$) *vs* el $\log_{10}$ (dilución). La pendiente de dicha curva dio un valor absoluto por debajo de 0,1 por lo cual podemos asumir que las eficiencias de las dos qPCR fueron similares, y por tanto pudimos aplicar el método para cuantificar en forma relativa la expresión de IFN-γ (Fig. A2-C). En función de esto, para las diferentes qPCR optimizadas definimos como punto de corte que las eficiencias fueran entre 95 y 105%.

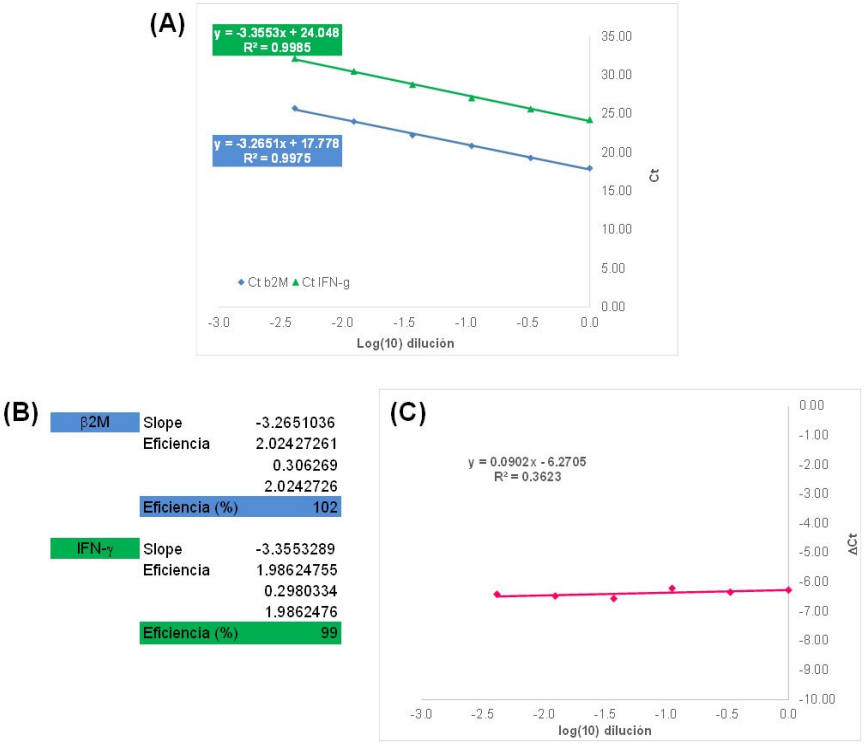

Figura A2. Validación del método 2-ΔΔCT. (A) Gráfica de Ct *vs* el Log_{10} (dilución). Un pool de tres ADNc, preparado a partir de ARN de tres muestras de sangre, fue diluido al tercio, y cada dilución fue utilizada como molde para las qPCR específicas deβ2M e IFN-γ. La recta obtenida en el gráfico fue ajustada mediante un análisis de regresión lineal. Las pendientes de cada qPCR fueron utilizadas para calcular las eficiencias. (B) Tabla de cálculos de eficiencia de las qPCR para β2M e IFN-γ. (C) Los ΔCt ($Ct_{\beta 2M}$ - $Ct_{IFN\text{-}\gamma}$) para cada dilución fueron calculados y graficados en función del $\log_{10}$ (dilución). Los datos fueron ajustados por regresión lineal, y luego fue calculada la pendiente de la curva.

b) <u>Definición del tipo de muestra donde estudiar la respuesta transcriptómica</u>

Dentro de los puntos a considerar para el desarrollo del proyecto, nos planteamos evaluar el tipo de muestra donde estudiar la respuesta transcriptómica inducida por la vacunación con

aftosa, para ello consideramos utilizar sangre entera o PBMC. El uso de sangre entera ha sido descrito en la bibliografía (Dar et al., 2015; Harrington et al., 2007; Parida et al., 2006b), y tiene como ventaja frente al uso de PBMC, que no requiere manipulación previa a la estimulación minimizando la posibilidad de inducir la transcripción de genes que pudieran afectar los resultados contra el antígeno específico. Para esto, analizamos los niveles de expresión de los ARNm de β2M e IFN-γ en cultivos de sangre entera o PBMC de tres bovinos sanos provenientes del Campo Experimental del SENASA, estimulados con antígeno de aftosa, como se detalla en la Sección 2.3.1 (M&M). Los resultados mostraron que los niveles de Ct para el gen housekeeping (β2M) fueron similares para ambos tipos de cultivos asumiendo que se partió de cantidades similares de células (PBL o PBMC) para extraer el ARN.

En la Figura A3 se muestran los resultados de los niveles "*semi-absolutos*" del ARNm de IFN-γ para ambos métodos y para los tres bovinos. En dicha figura puede observarse que los niveles de expresión de este ARNm fueron similares. En función de ello, definimos como método de purificación la lisis de glóbulos rojos dado que: a) hay una menor manipulación de las muestras de sangre, por lo que evitamos que se inicie la transcripción de genes que pueden afectar nuestros resultados, b) es más económico, y c) se pueden procesar un mayor número de muestras por purificación.

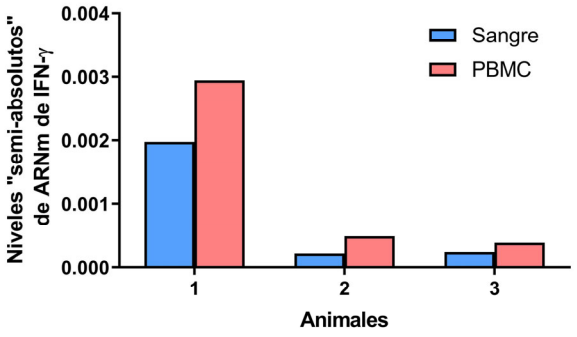

Figura A3. Niveles "*semi-absolutos*" del ARNm de IFN-γ a partir de células de cultivos de sangre entera (PBL) o PBMC

c) Elección del antígeno

Uno de los puntos críticos en este trabajo fue encontrar una preparación antigénica que estimule una respuesta transcripcional diferencial respecto al vehículo en el cual fue preparado el antígeno. Un "buen" antígeno nos permitiría obtener una buena señal en términos de marcadores de protección en animales vacunados mientras que en animales no vacunados esperamos ver una ausencia de dicha respuesta frente al antígeno. La priorización de la puesta a punto del ensayo de estimulación *in vitro* con antígeno nos llevó a tener un retraso en los objetivos debido a que no fue posible avanzar a otros ítems hasta no resolver este punto. Durante la etapa, que incluyó 7 ensayos de potencia y/o eficacia y más de un año y medio de trabajo, fueron analizadas 10 preparaciones antigénicas (Tabla A4).

	Antígeno	Proceso	Vehículo
Ag1	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por gradiente de sacarosa	solución al 33% de sacarosa en buffer NET
Ag2	Partícula 140S Cepa A24 Cruzeiro	Purificación por gradiente de sacarosa	solución al 33% de sacarosa en buffer NET
Ag3	Partícula 140S Cepa A24 Cruzeiro	Purificación por gradiente de sacarosa y diálisis contra PBS	PBS
Ag4	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por gradiente de sacarosa, diálisis contra PBS y concentración	PBS
Ag5	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por gradiente de sacarosa y concentración	Medio de cultivo AF035
Ag6	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Proveniente del proceso industrial y diafiltrada contra medio de cultivo AF035	Medio de cultivo AF035
Ag7	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por gradiente de sacarosa y diafiltrada contra medio de cultivo AF035	Medio de cultivo AF035
Ag8	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por gradiente de sacarosa y contra medio de cultivo AF035	Medio de cultivo AF035
Ag9	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por sacarosa, centrifugación y resuspensión del pellet con PBS	PBS
Ag10	Partícula 140S Cepa O1 Campos	Purificación por sacarosa, centrifugación y resuspensión del pellet con PBS	PBS

Tabla A4. Preparaciones antigénicas evaluadas durante el transcurso del proyecto.

Los antígenos del Ag1 al Ag8 fueron preparados con diferentes métodos de purificación del antígeno por la empresa colaboradora, sin embargo, todos mostraron que el vehículo, en el que se diluye el antígeno, presentaba niveles relativos del ARNm de IFN-γ, y de otras citoquinas, iguales o mayores que el antígeno en sí. El Ag9 fue la primera preparación con la que inducimos la expresión específica del ARNm de IFN-γ en animales vacunados frente a los no vacunados y no se vio estimulación con el vehículo utilizado. Este antígeno fue cedido por el Dr. Pérez-Filgueira (INTA) en el marco de una colaboración con la empresa colaboradora. En la Figura A4 se presentan los resultados de los niveles "*semi-absolutos*" del ARNm de IFN-γ en muestras de sangre de seis animales vacunados, tomada al 21 dpv, estimuladas con antígeno Ag7 y Ag9, y con sus respectivos vehículos. En dicha figura observamos que las muestras de sangre estimuladas con Ag9, en general, inducen una mayor

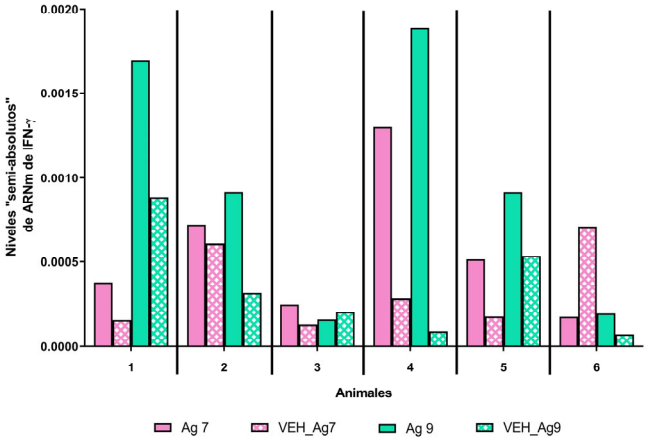

Figura A4. Niveles "*semi-absolutos*" del ARNm de IFN-γ en muestras de sangre de seis animales vacunados (21 dpv) estimuladas *in vitro* con Ag7, Ag9 y sus vehículos. Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M (housekeeping) y luego calculado los incrementos "*semi-absolutos*". Las barras lisas (Ag) corresponden a los incrementos obtenidos en las muestras de sangre estimuladas con Ag7 o Ag9. Las barras con trama (VEH) corresponden a los incrementos obtenidos en las muestras de sangre estimuladas con los vehículos de Ag7 o Ag9.

expresión del ARNm de IFN-γ, que la estimuladas con Ag7, lo cual a su vez favorece la relación de la expresión de IFN-γ entre estimulación con antígeno con respecto a la estimulación con el vehículo.

A partir de los resultados obtenidos con la preparación Ag9, el grupo del Dr. Peréz-Filgueira preparó un nuevo lote de antígeno con el mismo protocolo utilizado para la preparación Ag9. El nuevo lote fue denominado Ag10, y fue el antígeno utilizado para futuras estimulaciones. Este lote fue evaluado en animales vacunados y naïve (Fig.A5) pertenecientes a ensayos del Dr. Pérez-Filgueira. Cuando analizamos la estimulación en respuesta al Ag10 de la sangre de los animales vacunados *vs* naïve observamos que todos los vacunados responden a la estimulación antigénica (respuesta visualizada como un alto incremento en la expresión del ARNm de IFN-γ) mientras los naïve son no respondedores a dicha estimulación. Asimismo, notamos que el grupo de animales vacunados presenta una importante respuesta IFN-γ frente a la estimulación antigénica en comparación con los bajos valores observados cuando se les incuba con el vehículo. Los resultados evidencian también una gran variabilidad frente a la estimulación antigénica. Este resultado nos indicó que el Ag10 es una buena preparación antigénica dado que no estimula la respuesta de los naïve y tampoco lo hace su vehículo (PBS) por ello fue el antígeno utilizado para los ensayos experimentales. El protocolo optimizado de los ensayos de estimulación *in vitro* a partir de sangre y la preparación del antígeno fueron detallados en los Ítems 2.3 y 2.2 (M&M).

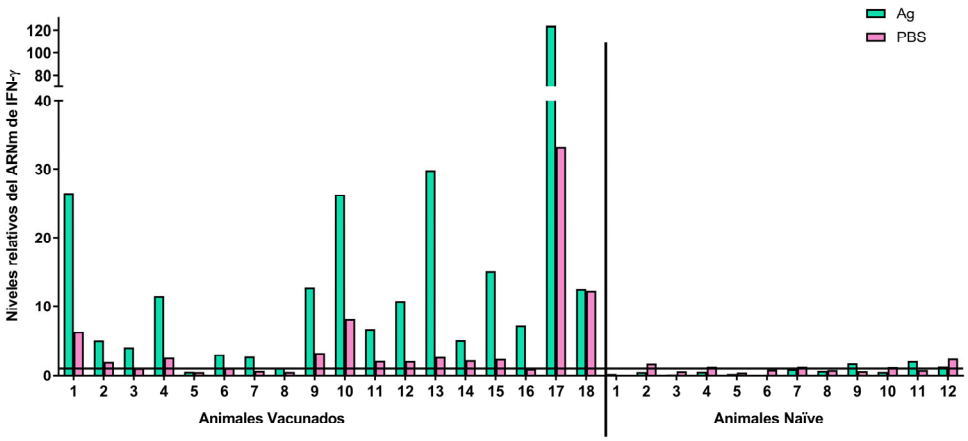

Figura A5. Niveles relativos de los niveles de ARNm de IFN-γ en muestras de sangre de animales vacunados y naïve en respuesta a la estimulación *in vitro* con el antígeno Ag10 y su vehículo (PBS). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados al promedio obtenido en las muestras de sangre de animales naïve estimuladas con PBS. La línea corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve estimuladas con PBS.

d) Puesta punto de concentración de antígeno para estimular

Definida la preparación antigénica para estimular se buscó determinar la concentración óptima de estimulación. Para ello, se estimuló sangre de seis animales vacunados y dos naïve por 6 h con diferentes concentraciones del Ag10 (100, 30, 10 y 3 μg/ml).

En función de los resultados del análisis dela expresion del ARNm de IFN-γ en la curva de respuesta al antígeno, determinamos que la concentración óptima para realizar la estimulación con el Ag10 en sangre entera es de 10 μg/ml (Fig. A6).

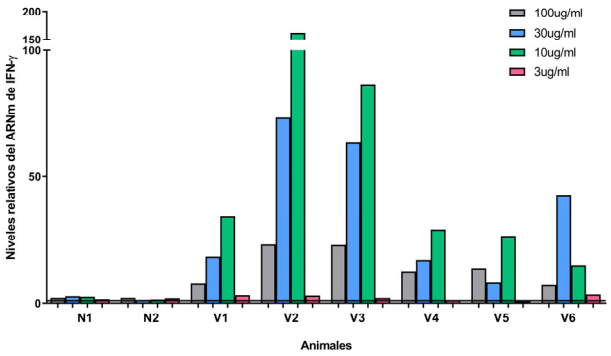

Figura A6. Curva de respuesta al antígeno de FMDV de animales naïve y animales vacunados. Cada barra corresponde a los niveles relativos del ARNm de IFN-γ en respuesta a 100, 30, 10 y 3 μg/ml del antígeno Ag10 en 2 animales naïve (N) y 6 vacunados (V). Para cada muestra, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados al promedio de las muestras sin estimular (PBS).

e) Cinética de expresión

Otro punto por optimizar fue el tiempo de estimulación *in vitro* con el antígeno de FMVD, para ello fueron evaluados dos tiempos de incubación 6 y 16h con el antígeno Ag10 a la concentración de 10 mg/ml. La sangre para estos ensayos fue obtenida de bovinos vacunados y naïve incluidos en dos ensayos de eficacia (Exp 7 y 8) con sangrías de 4h (Fig. A7). Los niveles de expresión de ARNm de IFN-γ frente a la estimulación durante 6 h fueron mayores, para casi todos los animales en ambos ensayos, que los observados a 16 h.

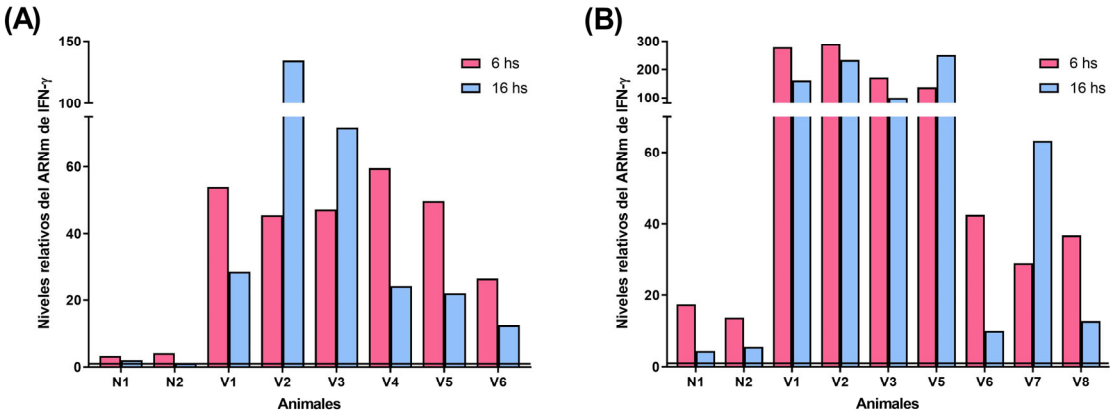

Figura A7. Comparación de los niveles relativos de los niveles de ARNm de IFN-γ en cultivos de sangre de animales vacunados (V) y naïve (N), de dos ensayos de eficacia (A y B), estimulada *in vitro* con el antígeno por 6 y 16 h. Para las muestras de cada condición, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados al promedio de los incrementos de las muestras de sangre de los bovinos naïve estimuladas con. La línea corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS).

f) Evaluación de las condiciones de transporte

Al inicio de la etapa experimental evaluamos el efecto del transporte de la sangre debido a que la logística incluía el traslado de las muestras desde el paralelo 42 a la ciudad de Buenos Aires. Para ello, simulamos las condiciones de tiempo y temperatura manteniendo muestras de sangre en recipiente de Telgopor con conservantes congelados durante 4, 8, 16 o 24 horas con muestras de sangre entera de bovinos sanos provenientes del Campo Experimental del Instituto de Higiene. Trascurrido los diferentes tiempos evaluados, lisamos los eritrocitos y determinamos la viabilidad de los linfocitos con Tripan Blue en cámara de Neubauer. Las diferentes condiciones de transporte mostraban niveles similares en la viabilidad de los linfocitos, y por ello, asumimos que la sangre puede ser mantenida hasta 24 horas luego de extraída, en cadena de frío, sin que la viabilidad disminuya significativamente.

Posteriormente, durante las pruebas donde evaluamos el antígeno preparado por Dr. Pérez-Filgueira (Ítem iv.1.2.1.c) accedimos a muestras de sangre de bovinos re-vacunados que se encontraban en la Provincia de Buenos Aires (INTA Castelar) a 4h del FIL. Para comparar las muestras con diferentes tiempos de extraídas como las provenientes del INTA o del campo experimental del SENASA (24h de extraída), dividimos la sangre del INTA en dos partes: una fue procesada luego de las 4h de transporte (condición que llamada "*sangre fresca*") y la otra parte fue conservada por 24 h a 4ºC (condición que llamada "*sangre conservada*").

Al comparar ambas condiciones, los resultados mostraron que en la condición "*sangre fresca*" es posible detectar niveles más altos de ARNm de IFN-γ frente a la estimulación que en la condición "*sangre conservada*" (Fig. A8). Las muestras de sangre estimuladas con PBS expresan niveles bajos de IFN-γ en ambas condiciones. Por este motivo, conjuntamente con la empresa colaboradora, decidimos utilizar sólo las muestras de sangre de bovinos de las pruebas de eficacia debido a la proximidad y por ende rápido acceso a las muestras.

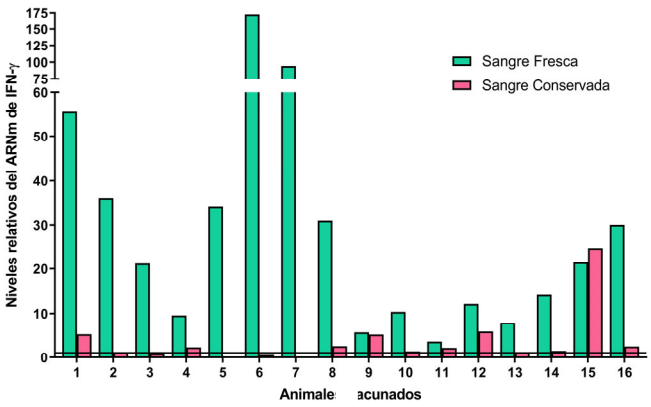

Figura A8. Comparación de los niveles relativos de ARNm de IFN-γ a partir de "sangre fresca" o "sangre conservada" de animales vacunados estimulada *in vitro* con el antígeno. Para las muestras de cada condición, los niveles de ARNm de IFN-γ fueron normalizados respecto al gen β2M y relativizados al promedio de los incrementos de las muestras de sangre de animales estimuladas con PBS de la condición respectiva. La línea corresponde al promedio del nivel relativo del ARNm de IFN-γ de las muestras de sangre de los bovinos naïve sin estimular (PBS).

g) Evaluación del efecto del anticoagulante

El efecto del anticoagulante sobre las qPCR fue evaluado mediante el análisis de los niveles de expresión de los ARNm de β2M e IFN-γ a partir de sangre extraída con heparina de litio o citrato de sodio de tres bovinos sanos. El nivel de expresión de los ARNm en cada animal fue similar en ambos tipos de muestras de sangre extraídas, por lo que las qPCR no se vieron afectadas por el anticoagulante utilizado. En particular, ha sido descripto en la bibliografía que la heparina podría inhibir las reacciones de PCR en tiempo real (Izreli et al., 1991; Yokota et al., 1999), sin embargo nuestros resultados no sugieren una inhibición asociada a este anticoagulante. Esto podría explicarse porque el protocolo utilizado incluye un paso de purificación de linfocitos donde eliminamos la mayor parte de las sustancias que pueden interferir en las qPCR como el anticoagulante y la hemoglobina. Por ello, y porque se reporta ampliamente el uso de la heparina en la bibliografía (Dar et al., 2015), es que decidimos utilizarla como anticoagulante para nuestros ensayos.

ANEXO 3

Lista genes surgidos de los microarray

Tabla A5. Lista de genes curada surgida del microarray Vacunados *vs* Naïve. En la tabla se muestra el LogQ: que es el incremento relativo del promedio de los bovinos vacunados protegidos comparado con el incremento de los bovinos vacunados no protegidos; el símbolo y el nombre del gen.

#	LOG_Q	Gene Symbol	Gene Name
1	3.634	CNTFR	Ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR)
2	3.447	PCDHB11	Protocadherin beta 11
3	3.422	JPH4	Junctophilin 4
4	3.308	ADGRG7	Adhesion G protein-coupled receptor G7
5	3.257	IL12B	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, p40)
6	3.248	SH3BP4	SH3 domain binding protein 4
7	3.172	PARK7	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
8	3.073	VGLL3	Vestigial like family member 3
9	3.042	OR13H1	Olfactory receptor, family 13, subfamily H, member 1
10	2.985	DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase
11	2.864	FNDC7	Fibronectin type III domain containing 7
12	2.787	MPPED2	Metallophosphoesterase domain containing 2
13	2.733	PKP1	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)
14	2.602	PGBD5	PiggyBac transposable element derived 5
15	2.557	SEMA4C	Semaphorin 4C
16	2.542	TTLL8	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 8
17	2.530	SLC39A12	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 12
18	2.506	TPBGL	Trophoblast glycoprotein like
19	2.499	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2
20	2.485	GPR179	G protein-coupled receptor 179
21	2.472	CLEC1A	C-type lectin domain family 1, member A
22	2.452	GJA5	Gap junction protein, alpha 5, 40kDa
23	2.452	SIX5	SIX homeobox 5
24	2.425	MMP15	Matrix metallopeptidase 15 (membrane-inserted)
25	2.355	P2RY6	Pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
26	2.354	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor
27	2.306	CD109	CD109 molecule
28	2.306	LOC782061	Aldo-keto reductase family 1, member C1-like
29	2.304	PLCZ1	Phospholipase C, zeta 1
30	2.220	COL27A1	Collagen, type XXVII, alpha 1
31	2.215	TRIM72	Tripartite motif-containing 72
32	2.192	PIGQ	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q
33	2.187	HRASLS5	HRAS-like suppressor family, member 5
34	2.145	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A
35	2.144	TCIM	TCIM transcriptional and immune response regulator
36	2.058	PLAT	Plasminogen activator, tissue
37	2.052	CIB3	Calcium and integrin binding family member 3
38	2.048	CD300LF	CD300 molecule like family member f (CMRF35-like molecule 1 isoform X1)
39	2.000	BIRC2	BIRC2 baculoviral IAP repeat containing 2
40	1.990	PRR15	Proline rich 15
41	1.990	KIN	KIN, antigenic determinant of recA protein homolog (mouse)
42	1.962	HAPLN3	Hyaluronan and proteoglycan link protein 3
43	1.923	C14H8orf46	Chromosome 8 open reading frame 46 ortholog
44	1.921	SMTNL1	Smoothelin-like 1
45	1.886	PPP1R16A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A
46	1.881	LOC104969336	LOC104969336 uncharacterized LOC104969336 [Bos taurus (cattle)]
47	1.881	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)
48	1.874	DKK4	Dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)
49	1.864	ZNF236	ZNF236 zinc finger protein 236 [Bos taurus (cattle)]
50	1.799	IFNLR1	IFNLR1 interferon lambda receptor 1
51	1.775	OPN4	Opsin 4
52	1.727	NYAP2	NYAP2 neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adaptor 2
53	1.707	TMEM139	Transmembrane protein 139
54	1.623	GPR26	G protein-coupled receptor 26
55	1.592	SLAMF1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
56	1.585	ICAM4	Intercellular adhesion molecule 4 (Landsteiner-Wiener blood group)
57	1.550	TKDP1	Trophoblast Kunitz domain protein 1
58	1.532	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)

59	1.522	TNF	Tumor necrosis factor
60	1.508	HOXB9	Homeobox B9
61	1.508	GHRL	Ghrelin/obestatin prepropeptide
62	1.488	ADARB2	Adenosine deaminase, RNA-specific, B2
63	1.461	USP35	USP35 ubiquitin specific peptidase 35
64	1.425	PDE1B	Phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
65	1.423	HES6	Hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)
66	1.419	GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
67	1.399	LIF	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
68	1.398	RASD2	RASD family, member 2
69	1.389	NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
70	1.379	NEUROD4	Neurogenic differentiation 4
71	1.366	NRBP2	Nuclear receptor binding protein 2
72	1.301	C15H11orf96	Hypothetical protein LOC100270684
73	1.252	PLCD3	Phospholipase C, delta 3
74	1.245	ANP32A	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
75	1.244	LSAMP	Neuronal growth regulator 1-like
76	1.218	RPL9	Ribosomal protein L9
77	1.211	KCNJ2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
78	1.201	LOC540707	Similar to cytochorme P450 2A19
79	1.178	PLK2	Polo-like kinase 2
80	1.168	SPSB1	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1
81	1.165	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha
82	1.161	PTRF	Polymerase I and transcript release factor
83	1.159	SPDYA	Speedy homolog A (Xenopus laevis)
84	1.155	MACC1	Metastasis associated in colon cancer 1
85	1.120	EDARADD	EDARADD EDAR associated death domain
86	1.081	N4BP1	NEDD4 binding protein 1
87	1.079	CXCR5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
88	1.069	NAA25	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit
89	1.053	S100A14	S100 calcium binding protein A14
90	1.015	FAM98B	FAM98B family with sequence similarity 98 member B
91	1.012	ZNF618	ZNF618 zinc finger protein 618
92	0.993	PLA2G2A	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
93	0.988	LOC504773	Regakine 1
94	0.986	PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
95	0.980	PDE4D	PDE4D phosphodiesterase 4D
96	0.969	GLRX5	Glutaredoxin 5
97	0.943	RAB9A	RAB9A, member RAS oncogene family
98	0.923	LDB1	LIM domain binding 1
99	0.922	MUC1	Mucin 1, cell surface associated
100	0.916	TLE6	TLE6 transducin like enhancer of split 6
101	0.913	HNRNPUL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2
102	0.896	MGC142908	Hypothetical LOC533569
103	0.895	GFPT2	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2
104	0.881	RUSC2	RUN and SH3 domain containing 2
105	0.865	GSTA4	Glutathione S-transferase alpha 4
106	0.837	ICAM5	Intercellular adhesion molecule 5, telencephalin
107	0.826	NACAD	NAC alpha domain containing
108	0.818	EFNB1	Ephrin-B1
109	0.815	ABHD5	Abhydrolase domain containing 5
110	0.807	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
111	0.803	BLCAP	Bladder cancer associated protein
112	0.799	DLST	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)
113	0.795	CDC42SE2	CDC42 small effector 2
114	0.791	TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
115	0.782	SLC25A26	Solute carrier family 25, member 26
116	0.774	PTGER2	Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa
117	0.761	ZNF609	ZNF609 zinc finger protein 609
118	0.723	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
119	0.710	PSMB9	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2)
120	0.702	NPY	Neuropeptide Y
121	0.672	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, memberA1
122	0.658	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
123	0.653	AHR	Aryl hydrocarbon receptor
124	-0.590	NECAP2	NECAP endocytosis associated 2
125	-0.612	TIMP2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2
126	-0.613	LAMTOR1	LAMTOR1 late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1
127	-0.616	CPEB2	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
128	-0.632	PAFAH1B3	Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 3 (29kDa)
129	-0.638	UBTF	UBTF upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
130	-0.662	SASH3	SAM and SH3 domain containing 3
131	-0.682	BOD1L1	BOD1L1 biorientation of chromosomes in cell division 1 like 1
132	-0.687	MCOLN1	Mucolipin 1
133	-0.689	PDLIM2	PDZ and LIM domain 2 (mystique)

134	-0.703	CDS2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2
135	-0.722	QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)
136	-0.731	TMEM39B	Transmembrane protein 39B
137	-0.731	RALB	V-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)
138	-0.736	ST6GALNAC2	ST6-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2
139	-0.736	TREM1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
140	-0.742	FLOT1	Flotillin 1
141	-0.744	FBXL5	F-box and leucine-rich repeat protein 5
142	-0.749	SLA	Src-like-adaptor
143	-0.750	PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1
144	-0.752	FEM1C	Fem-1 homolog c (C. elegans)
145	-0.762	PHF12	PHD finger protein 12
146	-0.764	CTBP2	C-terminal binding protein 2
147	-0.771	PGM2	Phosphoglucomutase 2
148	-0.771	SMUG1	Single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
149	-0.773	MINDY1	MINDY lysine 48 deubiquitinase 1
150	-0.774	STK40	Serine/threonine kinase 40
151	-0.792	SEC14L1	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)
152	-0.805	ADGRG5	ADGRG5 adhesion G protein-coupled receptor G5
153	-0.808	RIN3	Ras and Rab interactor 3
154	-0.829	RALBP1	RALBP1 ralA binding protein 1
155	-0.832	ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9
156	-0.834	HAUS4	HAUS augmin-like complex, subunit 4
157	-0.841	CTBP2	C-terminal binding protein 2
158	-0.843	DSCR3	Down syndrome critical region protein 3
159	-0.845	MYO1E	MYO1E myosin IE
160	-0.846	SLC22A5	Solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
161	-0.848	KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
162	-0.854	GLT25D1	Glycosyltransferase 25 domain containing 1
163	-0.857	AKR1C4	AKR1C4 aldo-keto reductase family 1, member C4
164	-0.864	FUCA2	Fucosidase, alpha-L- 2, plasma
165	-0.867	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A
166	-0.872	STXBP2	Syntaxin binding protein 2
167	-0.875	CHSY1	Chondroitin sulfate synthase 1
168	-0.882	EPN2	EPN2 epsin 2
169	-0.885	KCNN4	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
170	-0.905	SLC9B2	SLC9B2 solute carrier family 9 member B2 [Bos taurus (cattle)]
171	-0.913	SNX1	Sorting nexin 1
172	-0.916	IFNGR2	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
173	-0.917	HABP4	Hyaluronan binding protein 4
174	-0.920	GPC1	Glypican 1
175	-0.921	HPCAL1	Hippocalcin-like 1
176	-0.922	FNDC4	Fibronectin type III domain containing 4
177	-0.931	TXNRD1	thioredoxin reductase 1
178	-0.937	LOC100298890	LOC100298890 high mobility group protein 20A
179	-0.950	GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7
180	-0.966	C11H9orf116	C11H9orf116 chromosome 11 open reading frame, human C9orf116
181	-0.967	HLCS	Holocarboxylase synthetase
182	-0.977	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
183	-0.978	GUSB	Glucuronidase, beta
184	-0.979	USHBP1	Usher syndrome 1C binding protein 1
185	-0.979	CPEB4	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
186	-0.983	ZNF683	Zinc finger protein 683
187	-0.984	EHBP1L1	EHBP1L1 EH domain binding protein 1 like 1
188	-0.985	CEACAM1	CEACAM1 carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1
189	-0.986	DHRS13	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13
190	-0.986	TARM1	T cell-interacting, activating receptor on myeloid cells 1
191	-0.988	ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
192	-0.991	LAT2	Linker for activation of T cells family, member 2
193	-0.994	LRRC8E	leucine rich repeat containing 8 family, member E
194	-1.005	GLUL	GLUL glutamate-ammonia ligase
195	-1.012	ALDH3B1	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1
196	-1.013	ANKRD22	Ankyrin repeat domain 22
197	-1.013	RFX2	Regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)
198	-1.015	POMC	Proopiomelanocortin
199	-1.024	MTMR12	MTMR12 myotubularin related protein 12
200	-1.028	DNASE1L1	Deoxyribonuclease I-like 1
201	-1.033	CTSB	Cathepsin B
202	-1.033	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
203	-1.037	ADORA3	Adenosine A3 receptor
204	-1.045	RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family
205	-1.046	GAS7	Growth arrest-specific 7
206	-1.046	TSC22D1	TSC22D1 TSC22 domain family member 1
207	-1.049	PLXDC2	Plexin domain containing 2
208	-1.055	THUMPD3	THUMP domain containing 3
209	-1.055	KLK9	Kallikrein-related peptidase 9

210	-1.055	DHX34	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34
211	-1.056	ZCCHC24	ZCCHC24 zinc finger CCHC-type containing 24
212	-1.064	CNDP2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)
213	-1.065	RHOQ	RHOQ ras homolog family member Q
214	-1.066	SLC17A9	Solute carrier family 17, member 9
215	-1.066	ZNF407	Zinc finger protein 407
216	-1.068	LOC788112	Similar to myeloid secondary granule protein
217	-1.069	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
218	-1.071	TCN2	Transcobalamin II
219	-1.085	CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor alpha chain-like
220	-1.091	PBX4	Pre-B-cell leukemia homeobox 4
221	-1.098	ZMYND8	Zinc finger, MYND-type containing 8
222	-1.102	CYB5R4	Cytochrome b5 reductase 4
223	-1.103	STX18	Syntaxin 18
224	-1.113	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2
225	-1.114	ESYT1	Extended synaptotagmin-like protein 1
226	-1.116	OSBPL1A	Oxysterol binding protein-like 1A
227	-1.116	CRYL1	Crystallin, lambda 1
228	-1.122	JUB	Jub, ajuba homolog (Xenopus laevis)
229	-1.123	PADI2	Peptidyl arginine deiminase, type II
230	-1.124	MGC139367	Hypothetical LOC525690
231	-1.135	CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
232	-1.135	ADAM8	ADAM metallopeptidase domain 8
233	-1.144	CD68	CD68 molecule
234	-1.154	SLC31A2	Solute carrier family 31 (copper transporters), member 2
235	-1.160	SIPA1	Signal-induced proliferation-associated 1
236	-1.168	SKAP2	Src kinase associated phosphoprotein 2
237	-1.172	EMP1	Epithelial membrane protein 1
238	-1.174	FTSJ2	FtsJ homolog 2 (E. coli)
239	-1.179	NPBWR1	Neuropeptides B/W receptor 1
240	-1.190	SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
241	-1.192	TINAGL1	Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1
242	-1.199	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
243	-1.203	MGC137211	MGC137211 protein HP-25 homolog 2
244	-1.204	ANXA5	Annexin A5
245	-1.209	CAPN10	Calpain 10
246	-1.223	ARHGEF28	ARHGEF28 Rho guanine nucleotide exchange factor 28
247	-1.227	OGFRL1	Opioid growth factor receptor like 1
248	-1.232	MXI1	MAX interactor 1
249	-1.235	AOAH	Acyloxyacyl hydrolase (neutrophil)
250	-1.236	CNGB1	Cyclic nucleotide gated channel beta 1
251	-1.247	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
252	-1.248	DOCK7	Dedicator of cytokinesis 7
253	-1.257	DOCK4	Dedicator of cytokinesis 4
254	-1.259	RGS2	Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
255	-1.266	EHD4	EH-domain containing 4
256	-1.270	CLEC12A	C-type lectin domain family 12, member A
257	-1.274	LOC512005	Hypothetical protein
258	-1.281	ZFAND2A	Zinc finger, AN1-type domain 2A
259	-1.281	SEC24D	SEC24D SEC24 homolog D, COPII coat complex component
260	-1.296	TGFA	TGFA transforming growth factor alpha
261	-1.298	RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
262	-1.299	AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
263	-1.302	FERMT3	Fermitin family member 3
264	-1.303	MAOA	Monoamine oxidase A
265	-1.309	GPR137B	G protein-coupled receptor 137B
266	-1.319	ZNF576	Zinc finger protein 576
267	-1.320	LOC514257	Hypothetical LOC514257
268	-1.321	CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
269	-1.325	NAXD	NAXD NAD(P)HX dehydratase
270	-1.327	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
271	-1.332	CAPG	Capping protein (actin filament), gelsolin-like
272	-1.333	PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
273	-1.341	RRAGD	Ras-related GTP binding D
274	-1.342	LOC510406	Similar to cytochrome P450, family 2, subfamily J
275	-1.361	TPM4	Tropomyosin 4
276	-1.363	LHFPL2	Lipoma HMGIC fusion partner-like 2
277	-1.364	SSPO	SCO-spondin homolog
278	-1.368	LOC508879	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1-like
279	-1.369	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family
280	-1.373	DAGLB	Diacylglycerol lipase, beta
281	-1.380	C1RL	C1RL complement C1r subcomponent like
282	-1.388	CXCR1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1
283	-1.391	WRAP73	WRAP73 WD repeat containing, antisense to TP73
284	-1.401	IL13RA1	IL13RA1 interleukin 13 receptor, alpha 1
285	-1.404	WDFY3	WDFY3 WD repeat and FYVE domain containing 3
286	-1.419	ARHGEF2	ARHGEF2 Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2

287	-1.423	KIRREL3	Kin of IRRE like 3 (Drosophila)
288	-1.434	HEBP1	Heme binding protein 1
289	-1.445	JAG1	Jagged 1
290	-1.466	CMKLR1	CMKLR1 chemerin chemokine-like receptor 1
291	-1.470	MCTP2	Multiple C2 domains, transmembrane 2
292	-1.494	AREG	Amphiregulin B
293	-1.498	ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21
294	-1.506	AHNAK	AHNAK nucleoprotein
295	-1.509	SSLP1	Secreted seminal-vesicle Ly-6 protein 1
296	-1.512	SCARF1	Scavenger receptor class F, member 1
297	-1.519	ADGRG3	ADGRG3 adhesion G protein-coupled receptor G3
298	-1.532	PUS10	Pseudouridylate synthase 10
299	-1.556	PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
300	-1.558	ACAD8	Acyl-CoA dehydrogenase family, member 8
301	-1.566	TSPAN2	Tetraspanin 2
302	-1.580	CD36	CD36 molecule
303	-1.580	SLC13A5	Solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5
304	-1.582	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
305	-1.601	BCAN	Brevican
306	-1.609	ATP1B1	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide
307	-1.609	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
308	-1.617	CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
309	-1.640	IGF1	IGF1 insulin like growth factor 1
310	-1.669	HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
311	-1.686	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)
312	-1.693	CD14	CD14 molecule
313	-1.693	RUFY4	RUN and FYVE domain containing 4
314	-1.713	SMPD3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)
315	-1.720	TG	Thyroglobulin
316	-1.724	FAM129B	Family with sequence similarity 129 member B
317	-1.750	TTC3	Tetratricopeptide repeat domain 3
318	-1.756	HOMER3	Homer protein homolog 3-like
319	-1.757	FBXL14	F-box and leucine-rich repeat protein 14
320	-1.760	HPSE	Heparanase
321	-1.772	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1
322	-1.790	CD101	CD101 molecule
323	-1.845	TK2	TK2 thymidine kinase 2, mitochondrial
324	-1.879	EMB	EMB embigin
325	-1.889	ZNF740	Zinc finger protein 740
326	-1.907	RGL1	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1
327	-1.954	ITGAE	Integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
328	-1.970	OLFM4	Olfactomedin 4
329	-1.988	FAM20A	FAM20A, golgi associated secretory pathway pseudokinase
330	-2.024	UPP1	Uridine phosphorylase 1
331	-2.142	LRP1	LRP1 LDL receptor related protein 1
332	-2.143	CDC42BPB	CDC42BPB CDC42 binding protein kinase beta
333	-2.148	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor
334	-2.196	OPHN1	Oligophrenin 1
335	-2.196	PILRA	Paired immunoglobin-like type 2 receptor alpha
336	-2.230	CD180	CD180 molecule
337	-2.281	MMP9	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
338	-2.283	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
339	-2.296	SNX24	Sorting nexin 24
340	-2.300	DCBLD1	DCBLD1 discoidin, CUB and LCCL domain containing 1
341	-2.304	VCAN	Versican
342	-2.315	CLEC5A	C-type lectin domain family 5, member A
343	-2.335	MXD1	MAX dimerization protein 1
344	-2.337	S100A9	S100 calcium binding protein A9
345	-2.412	SHTN1	Shootin 1
346	-2.445	MAP4K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
347	-2.449	DFNA5	Deafness, autosomal dominant 5
348	-2.450	TMED10	Transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)
349	-2.454	ABCA6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6
350	-2.457	ABCA	ATP binding cassette subfamily A member 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30]
351	-2.523	GPR77	G protein-coupled receptor 77
352	-2.528	ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
353	-2.567	SGSM1	SGSM1 small G protein signaling modulator 1
354	-2.598	AVIL	Advillin
355	-2.600	DMBT1	DMBT1 deleted in malignant brain tumors 1
356	-2.608	GALNT3	GALNT3 polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
357	-2.622	CCDC80	Coiled-coil domain containing 80
358	-2.654	CD93	CD93 molecule
359	-2.796	THBD	Thrombomodulin
360	-2.799	THBS1	Thrombospondin 1

361	-2.800	C5AR1	Complement component 5a receptor 1
362	-2.826	C17orf67	Chromosome 17 open reading frame 67 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27900]
363	-2.863	LOC100336941	LOC100336941 carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7-like
364	-2.865	HIP1	HIP1 huntingtin interacting protein 1
365	-2.892	NRP1	Neuropilin 1
366	-3.062	XIST	X (inactive)-specific transcript
367	-3.159	RBX1	Ring-box 1, E3 ubiquitin protein ligase
368	-3.190	CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
369	-3.694	FGF18	Fibroblast growth factor 18

Tabla A6. Lista de genes surgida del microarray Vacunados Protegidos *vs* Vacunados No-Protegidos. En la tabla se muestra el LogQ: que es el incremento relativo del promedio de los bovinos vacunados protegidos comparado con el incremento de los bovinos vacunados no protegidos; el símbolo y el nombre del gen.

#	LOG_Q	Gene Symbol	Gene Name
1	10.223	BoLA-DQB	MHC class II antigen
2	3.973	PSMG2	Proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2
3	3.885	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
4	3.884	ZNF106	Zinc finger protein 106
5	3.768	IFNG	Interferon, gamma
6	3.733	ARPP19	cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa
7	3.426	CEP95	Centrosomal protein 95
8	3.285	SCIN	Scinderin
9	3.249	EIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A
10	3.163	RP9	Retinitis pigmentosa 9 (autosomal dominant)
11	3.111	USP4	Ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)
12	3.040	SGF29	SAGA complex associated factor 29
13	3.034	RPRD1A	Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A
14	3.027	RCN1	Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
15	2.953	PCNT	Pericentrin (kendrin)-like
16	2.939	LUC7L3	LUC7-like 3 (S. cerevisiae)
17	2.913	GRAP	GRB2-related adaptor protein
18	2.845	MC5R	Melanocortin 5 receptor
19	2.752	DLAT	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase
20	2.698	TRAT1	T-cell receptor-associated transmembrane adapter 1
21	2.658	WSB2	WD repeat and SOCS box-containing 2
22	2.651	GIMAP4	GTPase, IMAP family member 4
23	2.642	SLAMF9	SLAM family member 9
24	2.632	ARIH1	Ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1
25	2.618	PEX10	Peroxisomal biogenesis factor 10
26	2.568	MTMR2	Myotubularin related protein 2
27	2.493	HLTF	Helicase like transcription factor
28	2.456	DECR2	2,4-dienoyl-CoA reductase 2
29	2.404	SIRT1	Sirtuin 1
30	2.378	RPS24	Ribosomal protein S24
31	2.358	TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
32	2.358	VPS54	Vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae)
33	2.354	GBP2	Guanylate-binding protein 2
34	2.283	ADGRG7	Adhesion G protein-coupled receptor G7
35	2.282	CCDC27	Coiled-coil domain containing 27
36	2.277	GBP4	Guanylate binding protein 4
37	2.236	CD300LF	CD300 molecule like family member f (CMRF35-like molecule 1 isoform X1)
38	2.215	GIMAP1	GTPase, IMAP family member 1
39	2.202	MS4A15	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 15
40	2.173	PITX3	Paired-like homeodomain 3
41	2.166	RPL36A	60S ribosomal protein L36a
42	2.135	KIR3DL2	Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5A
43	2.122	CCNB1	Cyclin B1
44	2.117	PURA	Purine-rich element binding protein A
45	2.111	CLEC1A	C-type lectin domain family 1, member A
46	2.091	NKX6-1	NK6 homeobox 1
47	2.085	HDAC2	Histone deacetylase 2
48	2.074	SIX5	SIX homeobox 5
49	2.074	P2RY6	Pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
50	2.056	IRF8	Interferon regulatory factor 8
51	2.046	ZNF829	Zinc finger protein 829
52	2.041	ZBTB8OS	Zinc finger and BTB domain containing 8 opposite strand

53	2.015	TCRA	T cell receptor, alpha
54	2.004	DECR2	2,4-dienoyl CoA reductase 2, peroxisomal
55	1.992	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
56	1.989	FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2
57	1.969	DENND1A	DENN/MADD domain containing 1A
58	1.969	RPL9	Ribosomal protein L9
59	1.965	SETD5	SET domain containing 5
60	1.939	CREB3	cAMP responsive element binding protein 3
61	1.937	RPL10	Ribosomal protein L10
62	1.935	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
63	1.905	GALE	UDP-galactose-4-epimerase
64	1.899	NUMB	Mumb homolog (Drosophila)
65	1.894	MAGED2	Melanoma antigen family D, 2
66	1.891	RPL36	Ribosomal protein L36
67	1.884	RPS11	40S ribosomal protein S11
68	1.879	TMEM150B	Transmembrane protein 150B
69	1.875	DYRK2	Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2
70	1.860	DOLK	Dolichol kinase
71	1.854	MRPS31	Mitochondrial ribosomal protein S31
72	1.853	JAK1	Janus kinase 1
73	1.842	RFT1	RFT1 homolog (S. cerevisiae)
74	1.833	STK38	Serine/threonine kinase 38
75	1.826	IMP4	U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)
76	1.816	SAA1	Serum amyloid A-like
77	1.814	IKBIP	IKK interacting protein
78	1.794	EPT1	Ethanolaminephosphotransferase 1 (CDP-ethanolamine-specific)
79	1.778	PPAP2A	Phosphatidic acid phosphatase type 2A
80	1.778	PRR11	Proline rich 11
81	1.774	IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
82	1.764	EOGT	Chromosome 3 open reading frame 64 ortholog
83	1.764	OR2Z1	Olfactory receptor, family 2, subfamily Z, member 1
84	1.763	BoLA-DRB3	Major histocompatibility complex, class II, DRB3
85	1.757	PHF8	PHD finger protein 8
86	1.754	SFRS15	Splicing factor, arginine/serine-rich 15
87	1.748	HPF1	Histone PARylation factor 1
88	1.745	GADD45B	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
89	1.740	CWC15	CWC15 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)
90	1.735	OFD1	Oral-facial-digital syndrome 1
91	1.735	PET112L	PET112-like (yeast)
92	1.729	ELOVL5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)
93	1.713	OPA1	Optic atrophy 1 (autosomal dominant)
94	1.713	RWDD3	RWD domain containing 3
95	1.684	CCT2	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)
96	1.682	JMJD6	Jumonji domain containing 6
97	1.667	VAPB	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C
98	1.659	NUDT9	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9
99	1.658	TSHZ1	Teashirt zinc finger homeobox 1
100	1.658	CEPT1	Choline/ethanolamine phosphotransferase 1
101	1.654	ERP44	Endoplasmic reticulum protein 44
102	1.654	TTF1	Transcription termination factor, RNA polymerase I
103	1.653	EDN1	Endothelin 1
104	1.645	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)
105	1.645	RANBP1	RAN binding protein 1
106	1.644	COX7A2L	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 like
107	1.644	NDUFA1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1, 7.5kDa
108	1.643	RPS21	Ribosomal protein S21
109	1.640	MALT1	MALT1 paracaspase
110	1.636	ZFP36L2	Zinc finger protein 36, C3H type-like 2
111	1.635	WDR44	WD repeat domain 44
112	1.633	FBXO18	F-box protein, helicase, 18
113	1.626	ASPHD2	Aspartate beta-hydroxylase domain containing 2
114	1.622	NUP54	Nucleoporin 54kDa
115	1.596	L2HGDH	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase
116	1.594	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3
117	1.593	TOMM70A	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (S. cerevisiae)
118	1.590	MOCS2	Molybdenum cofactor synthesis 2
119	1.579	PTRHD1	Peptidyl-tRNA hydrolase domain containing 1
120	1.579	TRAV16	T-cell receptor alpha variable 16
121	1.577	LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
122	1.572	PELP1	Proline, glutamate and leucine rich protein 1
123	1.572	GPR68	G protein-coupled receptor 68
124	1.566	PPCS	Phosphopantothenoylcysteine synthetase
125	1.556	MOCS1	Molybdenum cofactor synthesis 1
126	1.554	KCNA3	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 3
127	1.552	MRPS25	Mitochondrial ribosomal protein S25
128	1.549	ITCH	Itchy E3 ubiquitin protein ligase

129	1.546	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
130	1.544	ELN	Elastin
131	1.544	IAH1	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae)
132	1.544	HIST1H2AC	Histone cluster 1, H2ac
133	1.543	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13
134	1.535	AP3S1	Adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit
135	1.534	NUPR1	Nuclear protein, transcriptional regulator, 1
136	1.532	DHFR	Dihydrofolate reductase
137	1.531	HNRPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
138	1.525	NRTN	Neurturin
139	1.523	TOMM5	Translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog (yeast)
140	1.518	BZW2	Basic leucine zipper and W2 domains 2
141	1.516	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
142	1.515	RND1	Rho family GTPase 1
143	1.511	MCTS1	Malignant T cell amplified sequence 1
144	1.510	LOC786357	Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5A
145	1.505	TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)
146	1.502	MAN1B1	MAN1B1 mannosidase, alpha, class 1B, member 1
147	1.501	CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
148	1.501	LSM14B	SCD6 homolog B (S. cerevisiae)
149	1.474	AAMP	Angio-associated, migratory cell protein
150	1.466	DNTTIP2	Deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2
151	1.455	SEC23B	Sec23 homolog B (S. cerevisiae)
152	1.446	UNK	Unkempt homolog (Drosophila)
153	1.446	SLAMF7	SLAM family member 7
154	1.446	SUPV3L1	Suppressor of var1, 3-like 1 (S. cerevisiae)
155	1.445	MAK16	MAK16 homolog (S. cerevisiae)
156	1.442	LOC534630	RNA binding motif protein, X-linked 2-like
157	1.442	PIGM	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M
158	1.442	IGLL1	IGLL1 immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
159	1.441	RAB9A	RAB9A, member RAS oncogene family
160	1.432	RPS13	Ribosomal protein S13
161	1.430	LOC100138815	Ig lambda chain V-II region MGC
162	1.428	CHCHD4	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4
163	1.419	RPL4	Ribosomal protein L4
164	1.414	FH	Fumarate hydratase
165	1.395	UPB1	Ureidopropionase, beta
166	1.391	POLD3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
167	1.387	CREBZF	CREB/ATF bZIP transcription factor
168	1.386	EMILIN2	Elastin microfibril interfacer 2
169	1.366	LOC510382	Guanylate-binding protein 6-like
170	1.362	MBLAC2	Metallo-beta-lactamase domain containing 2
171	1.360	AGGF1	Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1
172	1.355	ANKIB1	Ankyrin repeat and IBR domain containing 1
173	1.340	CCDC34	Coiled-coil domain containing 34
174	1.326	SETD2	SET domain containing 2
175	1.320	ANKRD26	Ankyrin repeat domain 26
176	1.313	NDUFS2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2
177	1.299	ATP1B2	ATP1B2 ATPase Na+/K+ transporting subunit beta 2
178	1.298	PAK1	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
179	1.298	ASCC2	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2
180	1.291	MGAT2	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
181	1.285	GCDH	Glutaryl-CoA dehydrogenase
182	1.284	RPL12	Ribosomal protein L12
183	1.283	LATS1	LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)
184	1.282	ENPP4	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative)
185	1.263	NT5C3B	5'-nucleotidase, cytosolic III-like
186	1.262	CCNA2	Cyclin A2
187	1.254	BCR	RhoGEF and GTPase activating protein
188	1.254	PTMA	Prothymosin, alpha
189	1.228	AKR7L	AKR7L aldo-keto reductase family 7-like
190	1.221	ZKSCAN4	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 4
191	1.216	PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
192	1.206	ALKBH3	AlkB, alkylation repair homolog 3
193	1.205	CD164	CD164 molecule, sialomucin
194	1.202	ZSCAN23	Zinc finger and SCAN domain containing 23
195	1.179	LOC507443	similar to threonine aldolase 1
196	1.176	EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
197	1.169	MMD	Monocyte to macrophage differentiation-associated
198	1.168	ZNF326	Zinc finger protein 326
199	1.160	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
200	1.159	BTF3	Basic transcription factor 3
201	1.142	ZMAT5	Zinc finger, matrin-type 5
202	1.138	DDX18	DEAD-box helicase 18
203	1.133	ZNF266	Zinc finger protein 266
204	1.131	CHST10	Carbohydrate sulfotransferase 10
205	1.131	TADA2A	Transcriptional adaptor 2A
206	1.130	TSR1	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)

207	1.130	HPF1	Histone PARylation factor 1
208	1.121	CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3
209	1.111	PIGO	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O
210	1.102	RPP38	Ribonuclease P/MRP 38kDa subunit
211	1.099	UQCR11	Ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit
212	1.089	TMEM126B	Transmembrane protein 126B
213	1.086	APOBEC3Z2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B
214	1.081	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator
215	1.078	RAD21	RAD21 homolog (S. pombe)
216	1.072	ACOT11	Acyl-CoA thioesterase 11
217	1.070	MRPL46	Mitochondrial ribosomal protein L46
218	1.056	ATG16L1	ATG16L1 autophagy related 16 like 1
219	1.053	MARS	Methionyl-tRNA synthetase
220	1.025	WDR3	WD repeat domain 3
221	1.006	PPP5C	Protein phosphatase 5, catalytic subunit
222	0.985	FARSB	Phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit
223	0.963	KLHL2	Kelch-like 2, Mayven (Drosophila)
224	0.944	LSM7	U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
225	0.944	FNTB	Farnesyltransferase, CAAX box, beta
226	0.923	ABCF3	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3
227	0.911	GFER	Growth factor, augmenter of liver regeneration
228	0.889	ESPL1	Extra spindle pole bodies homolog 1 (S. cerevisiae)
229	0.877	COA7	Cytochrome c oxidase assembly factor 7
230	0.874	SIGMAR1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1
231	0.853	TMEM186	Transmembrane protein 186
232	0.831	LOC521010	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2
233	0.814	KBTBD4	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4
234	0.809	TOMM20	Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)
235	0.808	BUB3	Budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)
236	0.774	PPP2R3C	rotein phosphatase 2, regulatory subunit B'', gamma
237	0.743	ZBTB38	ZBTB38 zinc finger and BTB domain containing 38
238	0.730	EIF2B1	Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa
239	0.709	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
240	0.705	RPL7L1	Ribosomal protein L7-like 1
241	0.655	RAD23A	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)
242	0.653	AK2	Adenylate kinase 2
243	0.646	RPA2	Replication protein A2
244	-0.653	TRIO	Triple functional domain (PTPRF interacting)
245	-0.692	SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor
246	-0.740	LCN2	Lipocalin 2
247	-0.775	MYO5A	Myosin VA (heavy chain 12, myoxin)
248	-0.779	MYDGF	Myeloid derived growth factor
249	-0.786	UBTF	UBTF upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
250	-0.831	TRDC	TRDC T-cell receptor delta constant
251	-0.841	MDK	Midkine
252	-0.842	ALAS2	Aminolevulinate, delta-, synthase 2
253	-0.850	PKN2	Protein kinase N2
254	-0.886	NDE1	Nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans)
255	-0.916	ACSM2A	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2A
256	-0.923	CDC42BPG	CDC42 binding protein kinase gamma (DMPK-like)
257	-0.928	BOLA-DMB	Major histocompatibility complex, class II, DM beta-chain, expressed
258	-0.934	MXRA8	Matrix-remodelling associated 8
259	-0.959	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
260	-0.965	BLA-DQB	MHC class II antigen
261	-0.969	BTG2	BTG family, member 2
262	-0.988	GPSM2	G-protein signaling modulator 2
263	-0.999	GEMIN4	Fem (nuclear organelle) associated protein 4
264	-1.013	GJD4	Gap junction protein, delta 4, 40.1kDa
265	-1.038	WDFY2	WD repeat and FYVE domain containing 2
266	-1.040	GRASP	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein
267	-1.054	STAU2	Staufen, RNA binding protein, homolog 2 (Drosophila)
268	-1.061	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
269	-1.106	SLC9A5	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 5
270	-1.113	ZNF677	Zinc finger protein 677
271	-1.137	RNF13	Ring finger protein 13
272	-1.167	IFNGR2	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
273	-1.193	MFAP2	Microfibrillar-associated protein 2
274	-1.209	GPR137B	G protein-coupled receptor 137B
275	-1.243	GNG4	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4
276	-1.274	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1
277	-1.302	OR2AG2	Olfactory receptor, family 2, subfamily AG, member 2
278	-1.307	FTSJ2	FtsJ homolog 2 (E. coli)
279	-1.417	PPP2R5C	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B'gamma
280	-1.432	SLCO2B1	Solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
281	-1.446	USP53	Ubiquitin specific peptidase 53 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29255]
282	-1.515	LOC616707	Multidrug resistance-associated protein 4
283	-1.522	SLC20A2	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2
284	-1.529	LOC786254	Hhypothetical protein LOC786254

285	-1.554	ERCC6L	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like
286	-1.563	THRB	THRB thyroid hormone receptor beta
287	-1.578	CXCR2	Interleukin 8 receptor, beta
288	-1.609	UPP1	Uridine phosphorylase 1
289	-1.628	ADNCR	Adipocyte differentiation-associated long noncoding RNA
290	-1.635	LOC528607	Similar to TRD protein
291	-1.646	BCR	RhoGEF and GTPase activating protein

ANEXO 4

Resultados de test de enriquecimiento y REACTOME

# GO	Tipo	Término GO	p
GO:0030200	BP	Heparan sulfate proteoglycan catabolic process	1,82E-04
GO:2001268	BP	Negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway	2,88E-04
GO:0055119	BP	Relaxation of cardiac muscle	2,88E-04
GO:0071726	BP	Cellular response to diacyl bacterial lipopeptide	6,01E-04
GO:0002863	BP	Positive regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	8,39E-05
GO:0031579	BP	Membrane raft organization	3,03E-04
GO:0002675	BP	Positive regulation of acute inflammatory response	4,55E-04
GO:1904707	BP	Positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	5,48E-04
GO:0002456	BP	T cell mediated immunity	6,55E-04
GO:0071675	BP	Regulation of mononuclear cell migration	3,54E-04
GO:0042531	BP	Positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	1,18E-04
GO:0032729	BP	Positive regulation of interferon-gamma production	1,16E-05
GO:0071622	BP	Regulation of granulocyte chemotaxis	5,93E-04
GO:0070098	BP	Chemokine-mediated signaling pathway	6,68E-04
GO:0032760	BP	Positive regulation of tumor necrosis factor production	5,50E-04
GO:0045807	BP	Positive regulation of endocytosis	9,41E-06
GO:0045639	BP	Positive regulation of myeloid cell differentiation	5,39E-04
GO:0006898	BP	Receptor-mediated endocytosis	4,47E-07
GO:0050921	BP	Positive regulation of chemotaxis	3,06E-04
GO:0060326	BP	Cell chemotaxis	7,82E-05
GO:0032102	BP	Negative regulation of response to external stimulus	1,09E-06
GO:0043406	BP	Positive regulation of MAP kinase activity	1,36E-04
GO:0006954	BP	Inflammatory response	5,50E-06
GO:0050900	BP	Leukocyte migration	6,48E-04
GO:0051099	BP	Positive regulation of binding	3,49E-04
GO:0030335	BP	Positive regulation of cell migration	3,68E-07
GO:0042060	BP	Wound healing	4,37E-04
GO:0007155	BP	Cell adhesion	1,26E-07
GO:0010243	BP	Response to organonitrogen compound	1,22E-04
GO:0008283	BP	Cell proliferation	5,43E-04
GO:1901700	BP	Response to oxygen-containing compound	5,49E-05
GO:0016494	MF	C-X-C chemokine receptor activity	4,27E-05
GO:0019955	MF	Cytokine binding	4,03E-05
GO:0070820	CC	Tertiary granule	4,26E-04
GO:0045121	CC	Membrane raft	1,11E-11
GO:0045335	CC	Phagocytic vesicle	4,62E-04
GO:0030659	CC	Cytoplasmic vesicle membrane	2,29E-06
GO:0005764	CC	Lysosome	1,45E-05

Tabla A7 Términos GO funcionales biológicamente que se encuentran sobre-representados entre los genes que se expresan en bovinos vacunados en comparación con los naïve. BP: proceso biológico, MF: función molecular, CC: componente celular. El análisis fue realizado con la base de datos de la ontología GO publicada el 2018-07-03).

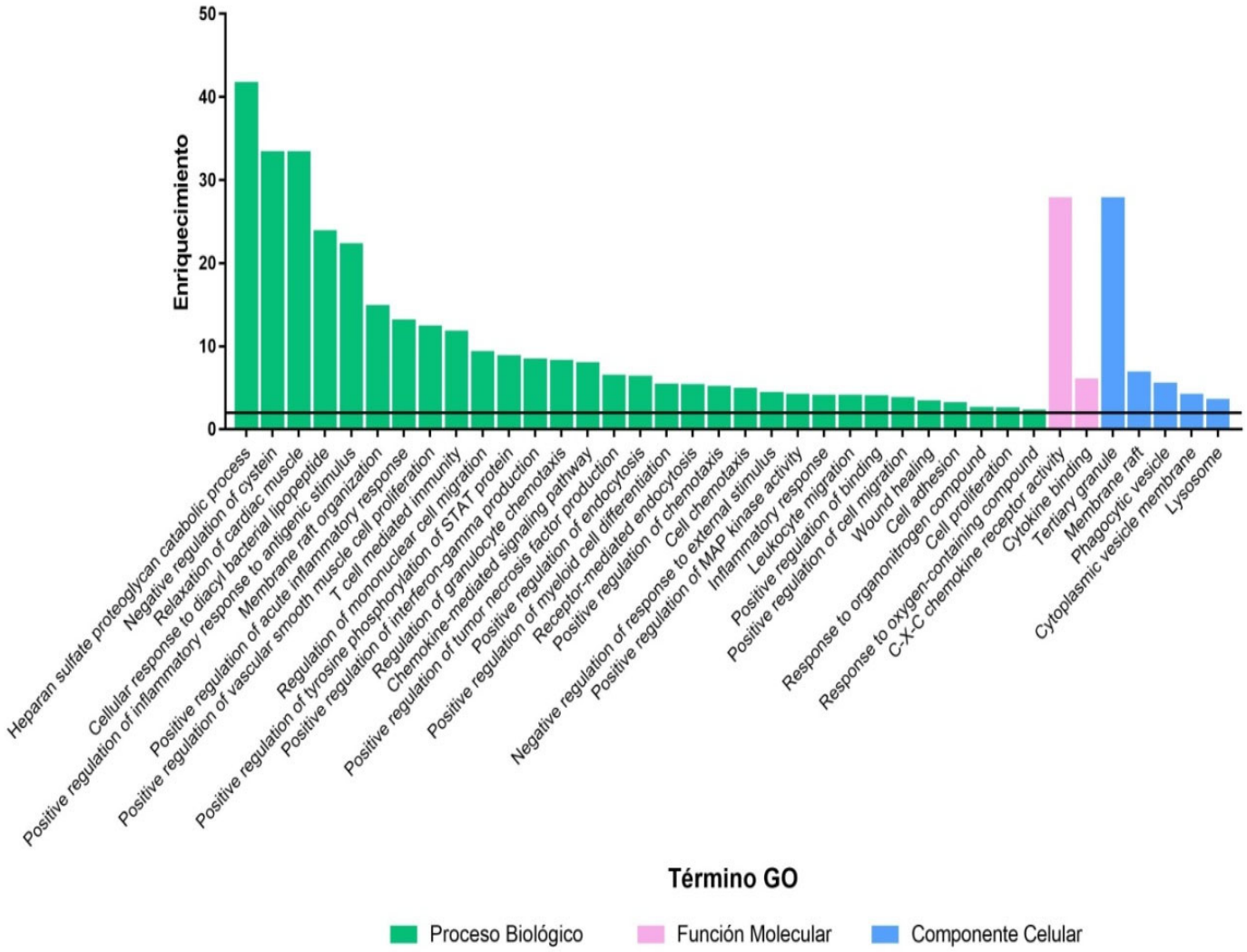

Figura A9. Valor de enriquecimiento de los términos GO sobre-representados entre los genes expresados en bovinos vacunados en comparación con bovinos naïve. El índice de enriquecimiento se define, para un GO determinado, como el cociente entre el número de genes encontrados en la lista problema dividido por el número de genes esperado si fuera por azar. Para esta tesis, consideramos un GO modificado cuando su índice de enriquecimiento es mayor o igual a 2.

Vía Metabólica	Valor *p*	Reacciones
Neutrophil degranulation	1.31E-10	*10/10*
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	4.32E-7	*17/46*
TNF receptor superfamily (TNFSF) members mediating non-canonical NF-kB pathway	1.62E-4	*7/12*
Platelet degranulation	2.45E-4	*5/11*
Interleukin-10 signaling	2.66E-4	*3/15*
TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	2.97E-4	*21/43*
Response to elevated platelet cytosolic Ca2+	3.91E-4	*5/14*
TNFR1-mediated ceramide production	7.77E-4	*3/3*
Signaling by Interleukins	9E-4	*139/551*
Immune System	1E-3	*357/1586*
Integrin cell surface interactions	1.11E-3	*10/54*
Extracellular matrix organization	1.91E-3	*75/318*
TNFs bind their physiological receptors	2.04E-3	*4/13*
Defective CHSY1 causes TPBS	3.3E-3	*2/2*
FOXO-mediated transcription of oxidative stress, metabolic and neuronal genes	3.45E-3	*6/34*
Cytokine Signaling in Immune system	3.68E-3	*175/699*
EGFR interacts with phospholipase C-gamma	4.3E-3	*3/3*
Innate Immune System	5.08E-3	*139/685*
Regulation of TP53 Expression	6.28E-3	*4/5*
Synthesis, secretion, and deacylation of Ghrelin	7.48E-3	*8/8*
Signaling by Overexpressed Wild-Type EGFR in Cancer	8.32E-3	*1/2*
Inhibition of Signaling by Overexpressed EGFR	8.32E-3	*1/2*
GRB2 events in EGFR signaling	1E-2	*2/3*
TNFR1-induced NFkappaB signaling pathway	1.21E-2	*5/5*
SHC1 events in EGFR signaling	1.62E-2	*4/4*
TNF signaling	1.64E-2	*20/29*
Toll-like Receptor Cascades	2.08E-2	*60/182*
Cargo concentration in the ER	2.4E-2	*4/12*
Defective B3GALT6 causes EDSP2 and SEMDJL1	2.42E-2	*1/1*
Defective B4GALT7 causes EDS, progeroid type	2.42E-2	*1/1*
Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade	2.71E-2	*44/95*
Defective B3GAT3 causes JDSSDHD	2.73E-2	*1/1*
Regulation of TNFR1 signaling	2.83E-2	*7/14*
Defective CHST14 causes EDS, musculocontractural type	2.89E-2	*1/1*
Defective CHST3 causes SEDCJD	2.89E-2	*1/1*
GAB1 signalosome	3.05E-2	*9/11*
IKK complex recruitment mediated by RIP1	3.39E-2	*3/3*
Uptake and function of diphtheria toxin	3.5E-2	*4/5*
Peptide ligand-binding receptors	3.7E-2	*13/75*
Chondroitin sulfate biosynthesis	3.76E-2	*9/9*
Cell surface interactions at the vascular wall	3.98E-2	*20/64*

Tabla A8. Vías metabólicas sobre-representadas en bovinos vacunados con respecto a los naïve. El valor *p* se obtiene del análisis estadístico de los datos de sobre-representación. La columna *Reacciones* muestra las reacciones sobre-expresadas en una vía determinada, por al menos una molécula, sobre el número total de reacciones de esa vía. Datos obtenidos de la base de datos Reactome Pathway versión 69 el 26/06/2019.

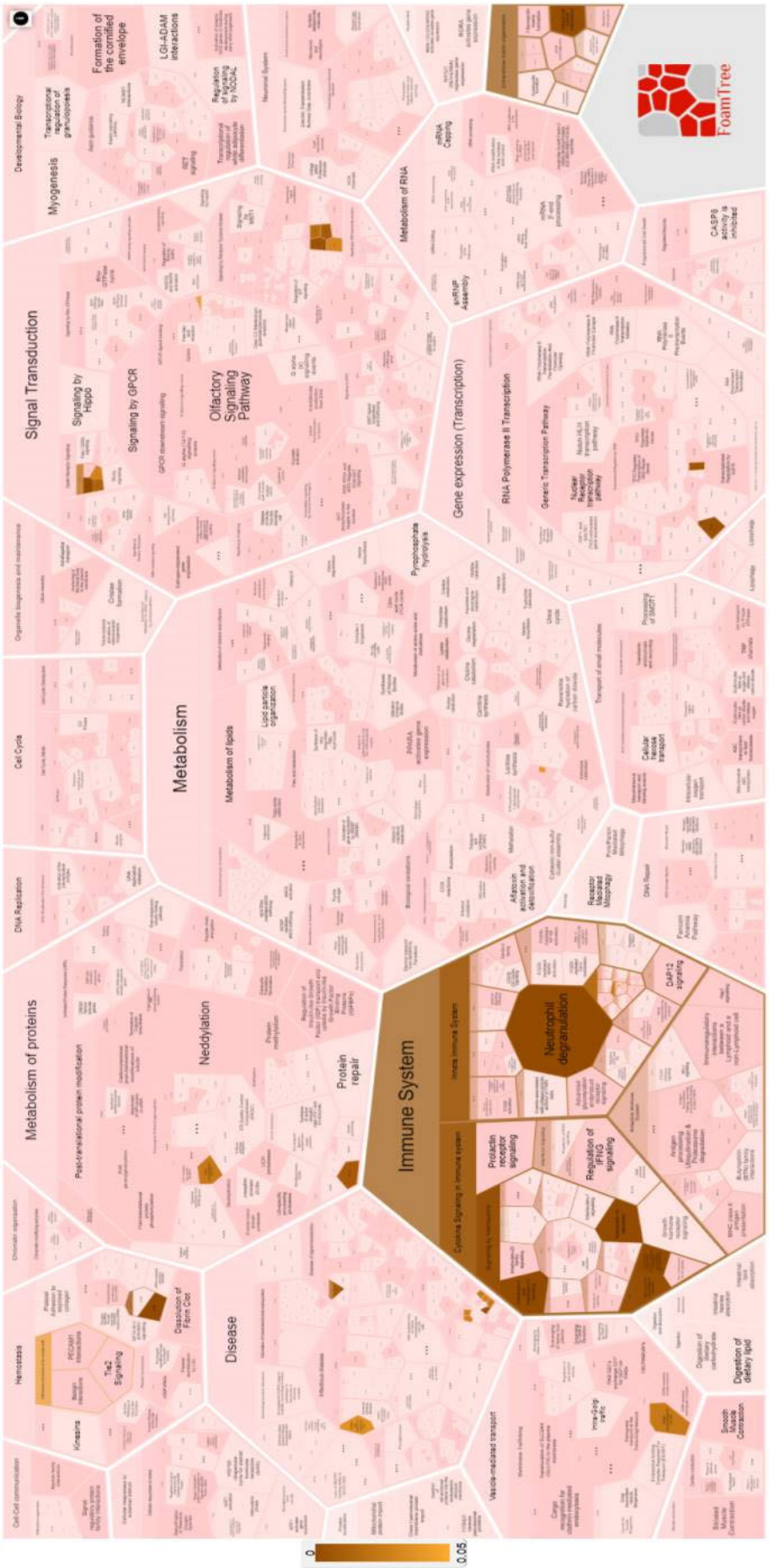

Figura A10. Representación gráfica de las vías metabólicas modificadas significativamente en bovinos vacunados comparados con los naïve. El código de color y tamaño de los títulos de la vías denota la sobre-representación de esa ruta en función del valor *p*. El análisis fue realizado utilizando la versión 69 de la base de datos del Reactome Pathway el 26/06/2019.

# GO	Tipo	Término GO	*p*
GO:1903047	BP	mitotic cell cycle process	2,80E-02
GO:0006412	BP	translation	3,20E-03
GO:0003723	MF	RNA binding	1,93E-04
GO:0022626	CC	cytosolic ribosome	1,24E-02
GO:0044391	CC	ribosomal subunit	9,34E-03

Tabla A9. Términos GO funcionales biológicamente que se encuentran sobre-representados entre los genes que se expresan en bovinos vacunados protegidos en comparación con los vacunados no protegidos. BP: proceso biológico, MF: función molecular, CC: componente celular. El análisis fue realizado con la base de datos de la ontología GO publicada el 2018-07-03)

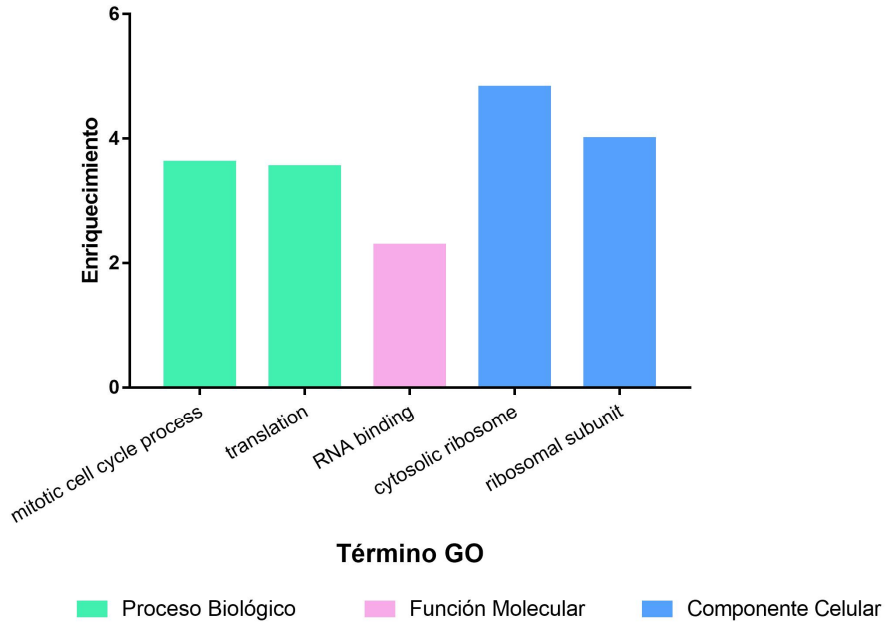

Figura A11. Valor de enriquecimiento de los términos GO sobre-representados entre los genes expresados en bovinos vacunados protegidos respecto a vacunados no protegidos. El índice de enriquecimiento se define, para un GO determinado, como el cociente entre el número de genes encontrados en la lista problema dividido por el número de genes esperado si fuera por azar. Para esta tesis, consideramos un GO modificado cuando su índice de enriquecimiento es mayor o igual a 2.

Vías Metabólicas	Valor *p*	Reacciones
Cap-dependent Translation Initiation	3.65E-7	16/18
Eukaryotic Translation Initiation	3.65E-7	18/21
Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	4.95E-7	1/1
GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	6.99E-7	3/3
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	6.99E-7	2/3
Nonsense-Mediated Decay (NMD)	1.04E-6	6/6
Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	1.04E-6	5/5
Peptide chain elongation	1.82E-6	4/5
Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol	2.58E-6	7/7
Eukaryotic Translation Elongation	3.13E-6	4/9
Formation of a pool of free 40S subunits	4.71E-6	2/2
Eukaryotic Translation Termination	4.71E-6	3/5
rRNA processing in the nucleus and cytosol	8.8E-6	8/15
Selenocysteine synthesis	1,00E-05	2/7
Viral mRNA Translation	1.01E-5	2/2
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	1.58E-5	5/5
rRNA processing	2.38E-5	9/21
Influenza Viral RNA Transcription and Replication	2.03E-4	4/14
Translation	2.1E-4	53/99
Translation initiation complex formation	2.27E-4	2/2
Ribosomal scanning and start codon recognition	2.81E-4	2/2
Selenoamino acid metabolism	2.85E-4	3/33
Regulation of expression of SLITs and ROBOs	3.17E-4	2/20
Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	3.44E-4	6/6
Influenza Life Cycle	4.13E-4	6/51
Transcriptional activation of p53 responsive genes	5.27E-4	4/5
Transcriptional activation of cell cycle inhibitor p21	5.27E-4	4/5
Influenza Infection	7.15E-4	7/59
Signaling by ROBO receptors	1.23E-3	3/60
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	1.57E-3	10/42
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	1.85E-3	6/17
Negative epigenetic regulation of rRNA expression	2.28E-3	10/12
Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	2.87E-3	1/3
Condensation of Prophase Chromosomes	3.14E-3	8/10
Cell Cycle, Mitotic	3.43E-3	142/322
NoRC negatively regulates rRNA expression	4.86E-3	6/7
Molybdenum cofactor biosynthesis	5.35E-3	3/6
Regulation of IFNG signaling	8.29E-3	2/4
Cell Cycle	9.71E-3	182/410
TFAP2 (AP-2) family regulates transcription of cell cycle factors	1.05E-2	3/4
Metabolism of RNA	1.07E-2	64/187
Costimulation by the CD28 family	1.31E-2	9/34
Generation of second messenger molecules	1.73E-2	4/17
RUNX3 regulates CDKN1A transcription	1.81E-2	3/6
Regulation of TNFR1 signaling	1.84E-2	7/14
Pink/Parkin Mediated Mitophagy	1.93E-2	1/8
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	2.1E-2	13/46
PCNA-Dependent Long Patch Base Excision Repair	2.16E-2	6/6
Translocation of ZAP-70 to Immunological synapse	2.34E-2	4/4
Mitotic Prophase	2.38E-2	18/34
RNA Polymerase I Promoter Clearance	2.53E-2	8/10
Epigenetic regulation of gene expression	2.77E-2	27/34
RNA Polymerase I Transcription	2.78E-2	12/14
Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains	2.91E-2	5/7
PD-1 signaling	2.91E-2	1/4
Signaling by cytosolic FGFR1 fusion mutants	2.96E-2	13/14
Lagging Strand Synthesis	2.96E-2	10/11
Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in GG-NER	3.25E-2	2/2
FOXO-mediated transcription of cell cycle genes	3.25E-2	5/22
ALKBH3 mediated reversal of alkylation damage	3.26E-2	6/6
Mitochondrial protein import	3.31E-2	2/14
TCR signaling	3.53E-2	22/52
ERCC6 (CSB) and EHMT2 (G9a) positively regulate rRNA expression	3.55E-2	4/4
DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	3.66E-2	7/18
Hypusine synthesis from eIF5A-lysine	3.81E-2	3/3
MASTL Facilitates Mitotic Progression	3.81E-2	3/4
Butyrophilin (BTN) family interactions	3.81E-2	1/8
RNA Polymerase I Transcription Initiation	4.02E-2	4/6
TNF signaling	4.02E-2	16/29
Downstream TCR signaling	4.14E-2	9/24
TNFR1-induced NFkappaB signaling pathway	4.22E-2	5/5
Recognition of DNA damage by PCNA-containing replication complex	4.22E-2	5/6
M Phase	4.42E-2	37/66
Mitophagy	4.58E-2	1/15
Resolution of AP sites via the multiple-nucleotide patch replacement pathway	4.94E-2	6/19
Defective RFT1 causes RFT1-CDG (CDG-1n)	4.97E-2	1/1

Tabla A10. Vías metabólicas sobre-representadas en bovinos vacunados protegidos con respecto a los vacunados no protegidos. El valor *p* se obtiene del análisis estadístico de los datos de sobre-representación. La columna *Reacciones* muestra las reacciones sobre-expresadas en una vía determinada, por al menos una molécula, sobre el número total de reacciones de esa vía. Datos obtenidos de la base de datos Reactome Pathway versión 69 el 26/06/2019.

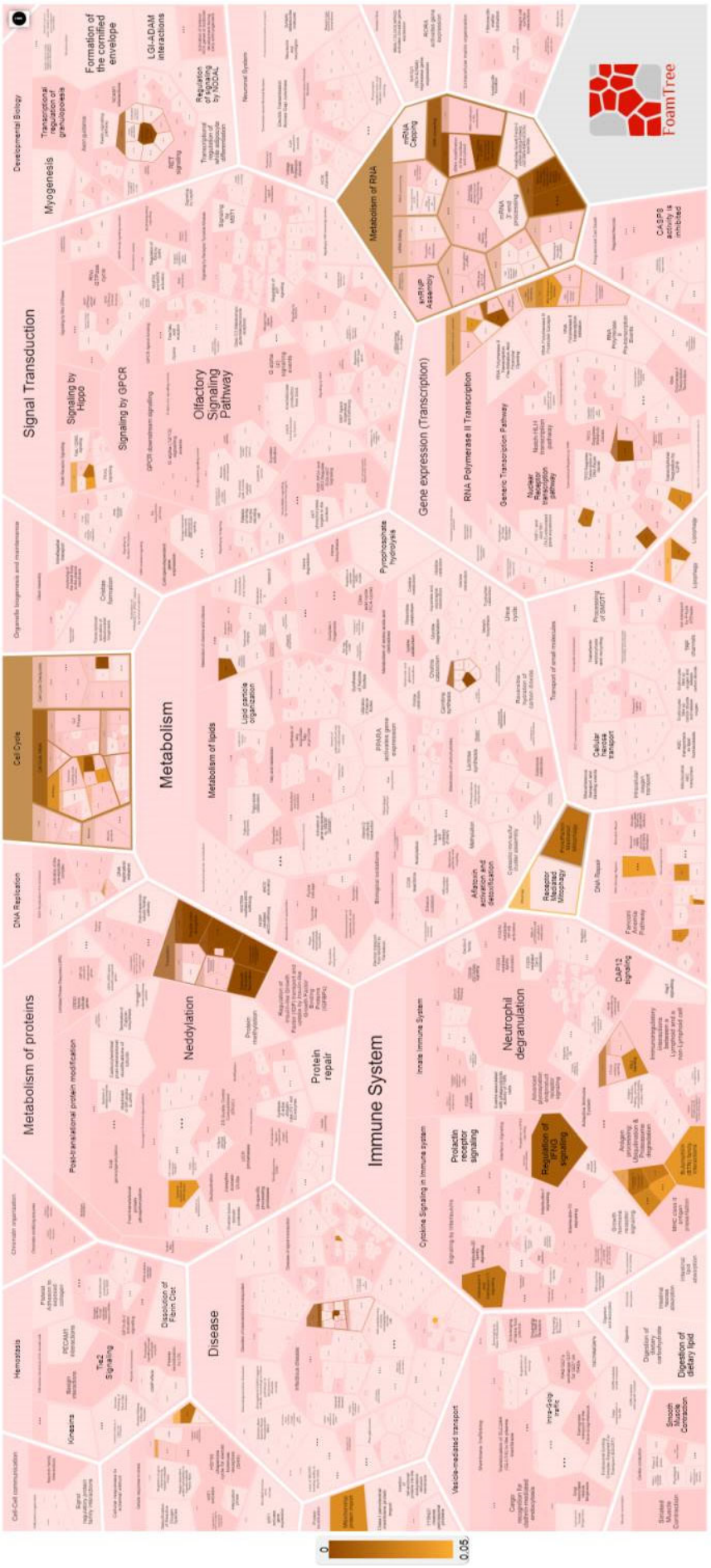

Figura A12. Representación gráfica de las vías metabólicas modificadas significativamente en bovinos vacunados y protegidos comparados con vacunados no protegidos. El código de color y tamaño de los títulos de la vías denota la sobre-representación de esa ruta en función del valor *p*. El análisis fue realizado utilizando la versión 69 de la base de datos del Reactome Pathway el 26/06/2019.

ANEXO 5

Artículo Científico

Veterinary Immunology and Immunopathology 202 (2018) 46–51

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

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

Research paper

Temporal evolution of anti-*Clostridium* antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccines

Andrea Rossi[a], Amy Mónaco[a], Julio Guarnaschelli[a], Fernando Silveira[a], Andrés Iriarte[a], Arndt G. Benecke[b,c], José A. Chabalgoity[a,*]

[a] Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
[b] CNRS UMR8246, Institut de Biologie Paris Seine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
[c] Center for Innate Immunity and Immune Disease, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Antibodies
Clostridium
Vaccines
Duration of immunity
Sheep

ABSTRACT

Polyvalent clostridial vaccines, composed of a complex mixture of toxoids from up to 9 different species, are highly effective in controlling clostridial diseases in cattle and sheep. Commercially available vaccines usually state that in normal field conditions two doses administered 4 to 6 weeks apart elicit protective antibody levels that will last for one year. However, studies on the development and duration of the antibody response against the different *Clostridium* species in target animals are scarce and only partial. Evaluating the temporal evolution of the antibody responses upon vaccination in target species is relevant to understand the bases of protective immunity induced by these vaccines and to develop new optimized vaccines.

Here, we assessed the antibody response in sheep against each *Clostridium* component of two different 9-valent Clostridial vaccines over the period of one year. One vaccine was a commercially available vaccine and the other was an experimental vaccine prepared by us with the same antigens that we used to set up a specific ELISA for each *Clostridium* species. Both vaccines showed similar results, irrespectively of the origin of the antigens used for the ELISAs, with antibody titers that peaked at day 36 after vaccination and large inter individual variations in the magnitude of the response. Antibody titers were maintained up to 90 days and then markedly decreased, becoming even undetectable in some animals 6 months after vaccination.

Given that the current scheme of yearly revaccination has largely shown to be effective at controlling the burden of disease, our results strongly suggest that circulating antibody levels cannot completely explain the protective immunity elicited by these vaccines, and prompt for further studies into the correlates of protection of clostridial vaccines.

1. Introduction

Clostridial diseases are a group of infectious diseases caused by bacteria of the genus *Clostridium* that represent a severe threat to health and productivity of cattle and sheep. During infection clostridia may proliferate rapidly in the host in response to different trigger factors, and produce potent toxins that can act local or systemically with highly damaging effects to the host. Each *Clostridium* species can produce one or more types of toxin with different effects. In livestock clostridia are the causative agents of a range of diseases, that include those causing enterotoxemias (*C. perfringens* types A, B and –C; *C. septicum*; *C. sordellii*), those affecting the parenchymatous organs (*C. novyi* and *C. haemolyticum*), those causing myonecrosis and toxemia (*C. chauvoei*; *C. novyi*; *C. perfringens* type A; *C. septicum*; *C. sordellii*), and those causing neurologic disorders (*C. botulinum* types C and D; *C. perfringens* type D; *C. tetanus*) (Lewis, 2011). Clostridia can enter the host by two routes. The oral route permits their growth and toxin release in the digestive tract, leading to the onset of intestinal diseases. Particularly, the preformed toxin of botulism in food is sufficient to cause the disease, not requiring active bacterial replication. The other route of entry is via a wound permitting anaerobic bacterial growth in necrotic tissues, which are deprived from oxygen. In this case the local secretion of toxins may generate gangrene or induce a neurological disease when toxin is transported to the central nervous system (e.g. tetanus) (Popoff and Bouvet, 2009).

Successful control of clostridial diseases has been achieved in most

Abbreviations: dpv, days post-vaccination; PCA, principal component analysis; MDS, multi-dimensional scaling

* Corresponding author at: Laboratory for Vaccine Research, Dpto.Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Avda. A. Navarro 3051, Montevideo, CP 11200, Uruguay.
E-mail address: jachabal@higiene.edu.uy (J.A. Chabalgoity).

https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.06.010
Received 27 September 2017; Received in revised form 31 May 2018; Accepted 10 June 2018
0165-2427/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

parts of the world by the systematic use of vaccines (Brown et al., 1976; Lewis, 2011). Commercially available vaccines differ in the number of *Clostridium* species included, ranging from monovalent to up to 10-component vaccines. In a few particular countries, e.g. Brazil, polyclostridial vaccines may also include *C. botulinum* types C and D although this is not the most common vaccine presentation. Vaccines are usually formulated as soluble inactivated toxoids from the different Clostridial species, although for some, particularly *C. chauvoei*, the inclusion of inactivated cellular material (bacterin) is required (Lewis, 2011). Aluminum-based adjuvants (aluminum hydroxide, aluminum phosphate and alum) are the most used for polyvalent clostridial vaccines; but oil adjuvants are also used for mono or bivalent vaccines. Vaccines may then vary significantly in their ability to induce protective immunity against different *Clostridium* species in target animals (Crichton et al., 1986; Green et al., 1987).

According to current regulations vaccine efficacy for each *Clostridium* species has to be first established by vaccination-challenge experiments in the target animal (efficacy trial) to get marketing approval, and then it should be regularly tested in alternative laboratory animals (potency test) for batch release (Council of Europe The European, 2017; U.S. Government Publishing Office, 2017). Antibody titers against *Clostridium* antigens have been long considered as the main correlate of vaccine-induced protection. In fact, regulatory agencies have established specific values of antibody levels against each *Clostridium* species, upraised in laboratory animals and tested *in vivo* by seroneutralization assays, as pass-mark levels for batch release approval of marketed vaccines (Council of Europe The European, 2017; Heldens et al., 2008; U.S. Government Publishing Office, 2017). It is generally accepted that 2 vaccine doses administered 4–6 weeks apart suffice to establish protective concentrations of antibodies. Also, it is usually stated in marketed vaccines that these antibodies levels will remain for a year above a minimal required value for protection, thus requiring annual booster vaccinations to maintain protection.

However, the dynamics of maintenance of circulating specific antibodies in the target species has not been studied in a comprehensive manner. Moreover, the few available studies are partial because they do not describe the response to all of the components of multivalent clostridial vaccines.

Here, we evaluated the antibody response in sheep against each of the *Clostridium* species elicited by two different vaccines: 1) a multivalent clostridial vaccine which has been in the market for years and is one of the most recognized vaccine in the field; and 2) an experimental vaccine with similar formulation prepared by us. In order to evaluate the antibody response, we developed a series of specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) against each of the included *Clostridium* species. We used for the ELISAs the same antigens than those used to prepared the experimental vaccine, thus allowing us to consider the potential bias in the response due to the nature of the antigen used for the ELISAs. We evaluated the individual variation of the humoral response induced by vaccination with each of the vaccines and the temporal evolution of specific antibodies over a period of one year post-vaccination.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-five 4-months-old Corriedale male lambs were used for the trial. All animals purchased from a local provider had not received any Clostridial vaccine before and were selected on the bases of absence of detectable levels of anti-clostridial antibodies before the beginning of the experiment. Throughout the study, sheep were maintained in sheepfold fed with alfalfa cubes and water ad libitum and were regularly evaluated by veterinarians. Before the trial, lambs were treated with anti-parasitic agent (Ivomec®, 1cc per 33 kg of weight). All the experimental procedures were performed at the farm facilities of the Instituto de Higiene, complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines, and were also approved by the Animal Experimentation Committee (Comisión de Experimentación Animal, CHEA), Universidad de la República, Uruguay.

2.2. Vaccines and antigens

Two clostridial vaccines were used: a commercially available vaccine Covexin10, MERCK & CO INC, lot # 1384A (Reference Vaccine), and an experimental vaccine (Experimental Vaccine) prepared by us. Both vaccines contain toxoids from *C. novyi* type B; *C. perfringens* types A, C and D; *C. septicum*, *C. sordellii* and *C. tetani*; and a bacterin from *C. chauvoei*. In addition, the reference vaccine includes toxoids from *C. haemolyticum*, whereas in the experimental vaccine, *C. haemolyticum* is included as a bacterin. Potassium alum and aluminium hydroxide gel, are the adjuvants for the reference and experimental vaccines respectively.

The experimental vaccine was prepared using antigens, either toxoids or bacterin, obtained from cultures of each specific *Clostridium* species included. Strains used were *C. chauvoei* (8070), *C. haemolyticum* (9693), *C. novyi* type B (6577); *C. perfringens* types A (8246), C (3181) and D (13170); *C. septicum* (547), *C. sordellii* (8780); all obtained from the National Collection of Type Cultures (NCTC), and *C. tetani* (H2B79 0709) from the Instituto de Higiene collection. Strains were cultured anaerobically in appropriate clostridial medium (Mueller and Miller media with variations) at 37 °C for 6–8 h except *C. tetani that* was cultured for 10 days. Cultures were then inactivated with formaldehyde (0.8% v/v), and complete toxin inactivation was verified by injecting intraperitoneally 0.5 ml of each preparation into mice. *C. chauvoei* and *C. haemolyticum* cultures, for bacterin preparation, were then diafiltrated with PBS and concentrated by ultrafiltration using membranes of 30 kDa *cut-off* and maintained refrigerated until use. Instead, inactivated *C. novyi* type B; *C. perfringens* types A, C and D; *C. septicum*, *C. sordellii* and *C. tetani* were centrifuged at 15,000 *g* for 10 min, the clear supernatant separated and then diafiltrated with PBS and concentrated by ultrafiltration using membranes of 30 kDa *cut-off* and maintained refrigerated until use. Sterility test was performed by inoculating the vaccine content into Tryptic soy Broth and Fluid Thioglycollate medium and incubating for 14 days at 37 °C. Residual formalin concentration in all antigens was measured after dialysis following the appropriate guidelines (VICH GL25 Biologicals: testing of residual formaldehyde).

The vaccine was prepared by mixing these antigens in amounts previously determined using a proprietary system for defining antigen content (patent pending) with aluminum hydroxide gel. The amount of adjuvant added was enough to reach a final concentration of aluminum in the vaccine of 1,5 mg per ml. Phenol was used as preservative.

Before use, the vaccine was evaluated for potency following appropriate guidelines (Council of Europe The European, 2017; U.S. Government Publishing Office, 2017) to confirm that they comply with the potency test for each of the *Clostridium* species included (data not shown).

2.3. Vaccination study

The sheep were randomly divided into two groups of 10 animals and assigned to receive one of the two vaccines (Experimental or Reference), while the other 5 remained unvaccinated as control group and received phosphate-buffered saline (PBS) instead. All animals received two subcutaneous doses, in opposite side of neck, of either one of the vaccines or PBS with a 21-day interval. Animal health was checked weekly during the whole study and local reactions at injection sites were monitored.

Blood samples were collected just before the first vaccine dose (day 0), 15 days after the second dose (day 36) and then at 90, 180 y 360 days post-vaccination (dpv). The serum was harvested and stored individually at −20 °C until assayed. To evaluate the temporal evolution

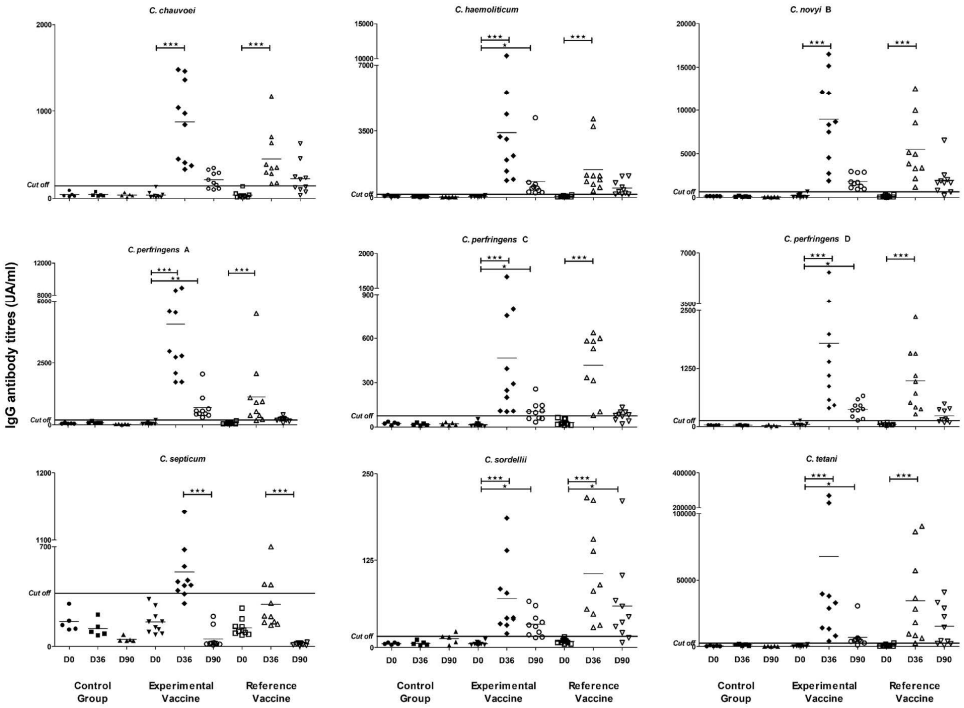

Fig. 1. Antibody levels against *Clostridium* antigens. In sera from sheep immunized with Experimental or Reference vaccine or left untreated (Control group). Results are shown as mean of IgG levels at 0, 36 and 90 dpv. Each dot represents a single animal. Differences in the group responses at different time points either within a group or between them are marked with asterisks when significant. Kruskal-Wallis test followed by Dunns' test $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.0001$.

of IgG levels against *Clostridium* spp. pools of sera were prepared for different groups and timepoints, including the sera from all the animals within each group (i.e. control group, n = 5; vaccinated groups n = 10).

2.4. Assessment of anti-clostridial antibodies

Serum antibody levels against the different clostridial components included in the vaccines were assessed using a specially developed ELISA specific for each *Clostridium* species. The antigens used to set up each specific ELISA were the same than those used to prepare the experimental vaccine, namely toxoids for *C. novyi* type B; *C. perfringens* types A, C and D; *C. septicum*, *C. sordellii* and *C. tetani*; and a bacterin for *C. chauvoei* and *C. haemolyticum*. They were obtained from cultures of each specific *Clostridium*, using the same strains that were included in the vaccine. Briefly, Nunc-Immuno ELISA plates (Nunc, Denmark) were coated with 20 μg per well of the correspondent antigen from each *Clostridium* species in 100 μl of PBS and incubated overnight at 4 °C. Plates were then washed with PBS-T (0.05% [vol./vol.] Tween 20 in PBS) and blocked for 1 h at 37 °C with 200 μl per well of 1% (wt/vol.) bovine serum albumin (BSA) (Sigma) in PBS-T. A standard curve for each antigen was prepared using a pool of sera from vaccinated sheep at day 36 after vaccination and used in each plate in 2-fold dilution series across 10 wells. After washing, standard curve and test sera (100 μl/well) were added in duplicates and incubated for 2 h at 37 °C. Test sera were evaluated in six 4-fold dilution series, so as take into account the large variability of the antiboby titres between sheep at each timepoint. Following washing, plates were incubated with 100 μl of a 1-in-3,000 dilution of donkey anti-sheep IgG (whole molecule)-peroxidase (HRP) conjugate (Sigma) at 37 °C for 1 h. Subsequently, 100 μl per well of the peroxidase substrate Fast OPD (Sigma) was incubated in the dark for 10 min. The reaction was stopped by the addition of 30 μl of 2 M sulfuric acid per well. Optical density values were measured at 492 nm in an ELISA microplate reader (Dynex Technology). To assign a value to each test sera, we chose 3 OD values from the 6 dilutions tested that lay within the range of linearity of the standard curve. Even though a single dilution could be used to interpolate and calculate the AU/ml for each serum, we understand that selecting the value obtained from 3 different dilutions and average them generates a more accurate titre.

In order to standardize the assay, we defined that to accept the results of a plate, the values of the standard curve obtained should be within the values of average curves +/- two standard deviations (SD). In addition, the coefficient of variation (CV) of all slopes was calculated to confirm that inter-assay variation was less than 20%. Antibody titres were expressed as arbitrary units (AU). To assign an AU value to each test sample, three OD values within the range of linearity were chosen and interpolated into the standard curve. These values were averaged, and SD and CV were calculated, in this case the intra-assay CV was less than 15%. On the other hand, before starting the experiment we defined a *cut-off* value for each clostridial antigen. For this, 45 naïve sheep were bled and assessed for reactivity against each of the antigens. The *cut-off* value was calculated as the average antibody titre of all these naïve sheep plus 3SD. All test samples above *cut-off* value were considered positive in response to vaccination. From these 45 naïve sheep we randomly selected the 25 animals that were used in the experiment.

2.5. Data and statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Considering the nonparametric nature of all data sets, the Kruskal–Wallis test was used for between-group comparative studies, followed by Dunns' test for multiple comparisons.

Principal component analysis (PCA) and clustering analyses were done using the fold increases for each animal of the antibody titers against each of the different Clostridial species at days 36 and 90. All analyses were run in PAST statistics software (Hammer et al., 2001) available at http://nhm2.uio.no/norlex/past/. Clustering was done using the Ward method and the Euclidean similarity measure. The bootstrap method with 500 replicates was used to estimate node support.

In all cases, the differences were considered significant when p-values were < 0.05.

3. Results

3.1. Inter-individual variability of the antibody response after vaccination

The individual antibody response against the different *Clostridium* species was assessed at 0, 36 and 90 days post-vaccination (dpv). The results are all shown in Fig. 1. Statistical comparisons were assessed for all time points within and between groups of animals, and those that showed significant differences are highlighted (Fig. 1). Prior to vaccination (day 0), all sheep showed antibody levels below the *cut-off* value. After 2 vaccine doses (36 dpv) all animals vaccinated with the experimental vaccine showed a positive, yet highly scattered, antibody response against each of the *Clostridium* species except for *C. septicum*. A similar picture was obtained with the reference vaccine, although in this group there were some animals that did not respond also against other species, i.e. *C. perfringens* type A or C and *C. tetani*. With regards to *C. septicum*, the individual response in both groups of vaccines differed. Whereas most of the animals receiving the experimental vaccine elicited an antibody response, only 3 out of 10 animals receiving the reference vaccine seroconverted (Fig. 1).

By 90 dpv the antibody responses had markedly decreased, although with some differences between antigens. For the experimental vaccine, all vaccinated animals remained seropositive to 4 antigens (*C. haemolyticum*, *C. perfringens* type A and D, and *C. novyi B*) whereas there were some seronegative animals for the other antigens. The response against the reference vaccine also showed large variations between individuals and only the response against *C. haemolyticum* remained above the *cut-off* value for all animals. The antibody levels against *C. septicum* antigens at 90 dpv were below the *cut-off* value for all animals irrespective of the vaccine used (Fig. 1). As expected, the antibody response from the control group remained below the *cut-off* value throughout the whole study.

Nevertheless, comparison between both groups of vaccinated animals showed no statistically significant differences in the response elicited by both vaccines against any of the antigens at any time point.

PCA was used to identify the main trends in the variability of antibody response among animals. We found that the first principal component accounted for 82.8% of the total variation in the data. The main variable contributing to the first principal component was the response to *C. tetani*, with a loading coefficient of 99.7%. The second principal component accounted for 13.1% of the remaining variation in the data. The response to *C. novyi* type B, with a loading coefficient of 93.5%, is the variable that contributes most to the second principal component, followed by the response to *C. perfringens* type A and C, with rather low loading coefficients, 22.6% and 17.5%, respectively (see Supplemental Fig. S1). Two animals that received the experimental vaccine (animals number 5 & 6) appeared located at the positive extreme of the "*x* axis", while other two of the same group (animals numbers 8 & 10) appeared located at the positive extreme of the "*y* axis" (see Supplemental Fig. S1). Thus, these four animals, which could be considered as high responders, displayed significantly increased antibody responses against *C. tetani* and *C. novyi* type B respectively. Clustering analysis of the animals according to their IgG titre fold increase against the different *Clostridium* species where in line with the PCA results, inasmuch these same four animals clustered in two groups apart from the other 16 vaccinated animals (see Supplemental Fig. S2B). Clostridial antigens were also clustered according to IgG titre fold increase observed in vaccinated animals. As shown in Supplemental Figure S2A, it is clear that *C. tetani* and *C. novyi* type B lay apart, whereas the other antigens could be roughly divided in two groups; one group comprised *C. perfringens* type C, *C. perfringens* type A, *C. haemolyticum* and *C. chauvoei*, while *C. sordellii*, *C. septicum* and *C. perfringens* type D clustered as a separate group (see Supplemental Fig. S2A).

In order to evaluate and minimize the impact of outliers in the multivariate analysis a distinct distance metric (Manhattan) in a non-linear space (MDS) was employed. Result revealed that the overall structure of the response to the reference vaccine is only slightly affected by inclusion of the experimental vaccine data (data not shown). Furthermore, when the so called high responder animals were removed from the analysis the clustering pattern and PCA observed trends remain highly similar, i.e. the antibody responses to *C. tetani* and *C. novyi* B were still significantly different from all the other *Clostridium* species, and the animals treated with any vaccine tend to cluster together in the PCA (data not shown).

3.2. Longevity of the anti-clostridial antibody response in target animals

Given the low values obtained at day 90 dpv, the humoral response elicited by the vaccines over a period of one year post-vaccination was assessed in pools of sera from each group of vaccines (Fig. 2). The results show that serum antibody levels after day 90 dpv are very low for all *Clostridium* species irrespective of the vaccine used, with values only marginally higher than the *cut-off* value for some antigens and clearly negative for others.

4. Discussion

Clostridial vaccines for sheep and cattle are widely available and have conclusively contributed to controlling the burden of clostridial diseases over many decades. Although there are almost no publicly available epidemiological reports, these diseases have nearly disappeared in countries where regular vaccination of livestock is in place demonstrating the protective efficacy of the vaccines in use. Most commercially available vaccines recommend annual revaccination, and in fact the absence of major outbreaks among vaccinated animals could suggest that overall animals are protected with this vaccination regime. However, a meta-analysis carried out on vaccines against *C. chauvoei* reported that revaccination in cattle is not usually practiced (Uzal, 2012), suggesting that there may be poor compliance with the annual revaccination regime worldwide. Regardless the lack of compliance with the annual revaccination, the burden of the disease is still controlled even when fewer than recommended doses might have been used supporting the effectiveness of the available vaccines. It could be that natural exposition to the pathogen provides the booster required.

The pathogenesis of the different clostridia markedly differs, and while for some of them the key for long lasting protection may be the development of a strong immunological memory that allows rapid development of antibodies after infection, for others, particularly botulism, a threshold of specific antibodies are essential for rapid neutralization of ingested preformed toxin. Still, antibodies against *Clostridium* antigens have long been considered as the main correlate of vaccine-induced protection, and usually marketed vaccines claim that antibodies levels are maintained during a year period. We found that both vaccines induce an antibody response against each of *Clostridium*

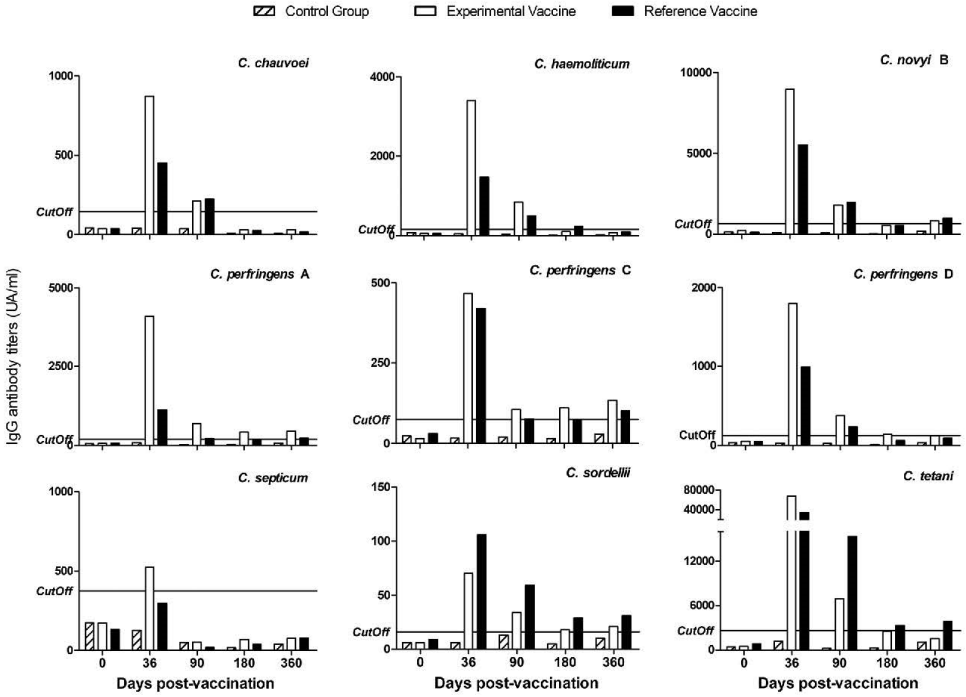

Fig. 2. Temporal evolution of IgG levels against *Clostridium* spp. in sheep with Experimental, Reference vaccine or Control group. Sera samples pools were evaluated at 0, 36, 90, 180 and 360 dpv. Control group, n = 5; Experimental, vaccine group, n = 10 or Reference vaccine group n = 10.

species soon after vaccination, but these antibodies declined by day 90 after vaccination and become undetectable for most of the antigens by 6 months. To the best of our knowledge, this is the first report showing the individual antibody response against all the components of a polyvalent Clostridial vaccine. A previous recent study also analyzed the antibody response induced by two multi-component vaccines (8 and 10-valent), but sera pools instead of individual samples were used for the analysis (Cerviño et al., 2011). Other reports evaluated the humoral response against some of the antigens; the three most frequently evaluated antigens were *C. perfringens* type D, *C. novyi* type B and *C. tetani* (Frerichs and Gray, 1975; Green et al., 1987; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985).

We found that a large variation in the individual antibody response and also that the responses of the animals vaccinated with the experimental vaccine had a tendency to be bigger. This could be related with the fact that the antigens used for the ELISA were the same than those used to prepare the experimental vaccine imposing a bias towards bigger responses in the experimental group. However, in all cases the differences between groups of animals (reference vs experimental vaccine), lacked of significance, suggesting that both vaccines performs similarly. We also evaluated the anti-tetanus response of all animals using recombinant Frag C of tetanus toxin as ELISA antigens, and interestingly the responses between groups behave similarly than when the native tetanus toxoid was used as antigen (results not shown), suggesting that the profiles or responses observed are consistent and independent of the antigen used for the ELISA.

In our study, PCA as well as clustering analysis showed that among the different antigens involved in our study, *C. tetani* and *C. novyi* type B appeared as inmunodominant antigens. Even if the 4 animals considered high responders were excluded from the analysis, still the antibody response against *C. tetani* and *C. novyi* would contribute the most to the first and second principal components. The particularities of these two components of polyvalent Clostridial vaccines have not been previously recognized, and our results suggest that this should be taken into consideration for the formulation of more optimized vaccines.

We also found that *C. septicum* induced the lower antibody response of all antigens. This result was particularly unexpected because both vaccines approved the potency test for this antigen. However, it could be in line with an earlier report that assessed the response induced by 16 batches of a 5-valent vaccine in sheep, rabbits and guinea pigs. It was found that the antibody response against *C. septicum* was the lowest compared to the other antigens tested (*C. perfringens* type D, *C. novyi* type B and *C. tetani*) (Webster and Frank, 1985). Consistently, Cerviño et al. (2011) reported that the antibody responses induced by an 8-valent vaccine were higher than the responses elicited by a 10-valent vaccine for all components except for *C. septicum*, but the study lacked statistical analysis of the data (Cerviño et al., 2011).

The variability and short duration of the antibody responses induced by the multivalent clostridial vaccines could be suggesting that antigenic competition is taking place. This phenomenon first described for model antigens almost half a century ago, has more recently been found to be present in multivalent fimbrial vaccines against *D. nodosus* in sheep, where animals vaccinated with multivalent fimbrial vaccines produced reduced and suboptimal antibody titers, and less protective efficacy when compared with a monovalent vaccine (Hunt et al., 1994; Raadsma et al., 1994; Schwartzkoff et al., 1993). The mechanism of antigenic competition has not yet been fully elucidated but several have been proposed, including suboptimal antigen presentation due to inadequate MHC-II binding of specific antigens, the number of T helper cells available, and the presence in the vaccine of immunologically

related antigens that "compete and confuse" the immune system (Dhungyel et al., 2014). To the best of our knowledge this phenomenon has not been described for clostridial vaccines so far. Comparative studies on the level and duration of the antibody responses elicited by mono-, bi- and multivalent clostridial vaccines, could shed light on this phenomenon and provide the bases for development of more efficient clostridial vaccines.

On the other hand, we found that the antibody responses elicited by each of the vaccines tested were highly scattered amongst individual animals for all the antigens involved. Similar findings were reported by Kerry and Craig (1979) that observed individual variation in antibody response against *C. perfringens* type D, *C. novyi* and *C. tetani* in the context of two clostridial vaccines (7 and 8-valent), and categorized the vaccinated animals in high, good and non-responders. Webster and Frank (1985) and Frerichs and Gray (1975) also reported scattered antibody responses in sheep against *C. perfringens* type D, *C. novyi* type B, *C. septicum* and *C. tetani*. However, the animals of those reports were not individualized (Frerichs and Gray, 1975; Kerry and Craig, 1979; Webster and Frank, 1985) thus it is not possible to conclude whether there were high and low responders against all the *Clostridium* species. Large variation in the antibody response was also reported in vaccinated cattle against *C. botulinum* type D in the context of a bivalent vaccine (*C. botulinum* types C and D) (Steinman et al., 2007).

A main finding of our work is that for most antigens the response was almost negligible 6-months after vaccination, which seems to be in clear contradiction with the one year duration of immunity proposed by commercial vaccines. Still, this result could be in concordance with reported results of cattle vaccinated with a bivalent *C. botulinum* types C and D vaccine, in as much as with the traditional vaccination schedule it was shown that only 15–31% of vaccinated cattle had significant antibody levels at the time of the annual booster. Further, the authors demonstrated that the addition of a booster at 6-month was enough to maintain antibody levels well above the *cut-off* values (Steinman et al., 2007). Similar results were also reported in goats vaccinated with monovalent vaccine against *C. perfringens* type D, showing that at 98 days post vaccination most animals did not have antibodies above the *cut-off* values (Uzal et al., 1998). Instead, Troxel et al. (1997) proposed that an antibody response against *C. perfringens* types C and D, and *C. chauvoei* could be detected 300 dpv in cows that received two doses (pre and post calving) of two 7-valent commercial vaccines, but the results presented lacked statistical significance (Troxel et al., 1997).

All in all, our results together with previous available data suggest that either circulating antibodies are not an appropriate biomarker of protective immunity in vaccinated animals or that it is very unlikely that target animals would still be protected one year after vaccination. The fact that there are no reports of major outbreaks worldwide prompt us to propose that there is another immune mechanism besides antibodies that allows immediate control of the clostridial diseases upon natural challenge. It could be that vaccinated animals with no detectable levels of anti-*Clostridium* circulating antibodies still have developed long term immunological memory. This would allow for rapid secondary responses upon infection that would still protect against a much lower infectious dose, as it might occur in normal field conditions. Revaccinating the animals one year after the initial vaccination to evaluate the development of an anamnestic response would provide evidence of this, and could support the claim of one year duration of immunity. However, this would be not the case for those Clostridia that require a threshold of circulating antibodies to neutralize highly potent toxins as tetanus or botulism, where preformed antibodies are essential for protection against these. Alternatively, it could be that in field conditions, natural exposure to the pathogens works as booster in vaccinated animals, extending the lifetime of antibodies responses.

Overall our results prompt for new studies into the correlates of protection of clostridial vaccines and support the view that field studies of vaccine effectiveness, such as those used in humans, may represent a more adequate alternative to evaluate the effectiveness of a vaccination regime than the challenge studies performed soon after vaccination currently in use.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by a project grant from C.S.I.C. (Uruguay) and FOCEM-MIEM grant (Uruguay), as well as an ECOS-Sud French-Uruguayan collaborative grant no. U14S03 to AGB and JAC. AR was supported by a fellowship from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay. We thank Rosina Piovani for her help in editing this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.06.010.

References

Brown, K.K., Parizek, R.E., Stewart, R.C., 1976. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. Vet. Med. Small Anim. Clin. 71, 1717–1722.
Cerviño, M., Figueras, L., Martin, S., Elvira, L., Callus, M., Dowlut, S., Engelhard, I., Calvo, E., Makoschey, B., 2011. Specific humoral response and effect on rectal temperature of two clostridial vaccines in lambs. Vet. Rec. 168, 458.
Council of Europe The European, D. for the Q. of M.& H., 2017. European Pharmacopoeia 9th Edition (9.1) [WWW Document]. URL http://online6.edqm.eu/ep901/.
Crichton, R., Harriss, D.A., McKay, D.J., 1986. Standards for Clostridium chauvoei vaccine–the relationship between the response of guinea pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent C. chauvoei. Aust. Vet. J. 63, 68–70.
Dhungyel, O., Hunter, J., Whittington, R., 2014. Footrot vaccines and vaccination. Vaccine 32, 3139–3146. http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.006.
Frerichs, G.N., Gray, A.K., 1975. The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. Res. Vet. Sci. 18, 70–75.
Green, D.S., Green, M.J., Hillyer, M.H., Morgan, K.L., 1987. Injection site reactions and antibody responses in sheep and goats after the use of multivalent clostridial vaccines. Vet. Rec. 120, 435–439.
Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4, 9.
Heldens, J.G.M., Patel, J.R., Chanter, N., Ten Thij, G.J., Gravendijck, M., Schijns, V.E.J.C., Langen, A., Schetters, T.P.M., 2008. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. Vet. J. 178, 7–20.
Hunt, J.D., Jackson, D.C., Brown, L.E., Wood, P.R., Stewart, D.J., 1994. Antigenic competition in a multivalent foot rot vaccine. Vaccine 12, 457–464. http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X(94)90125-2.
Kerry, J.B., Craig, G.R., 1979. Field studies in sheep with multicomponent clostridial vaccines. Vet. Rec. 105, 551–554.
Lewis, C.J., 2011. Control of important clostridial diseases of sheep. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 27, 121–126.
Popoff, M.R., Bouvet, P., 2009. Clostridial toxins. Future Microbiol. 4, 1021–1064. http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.72.
Raadsma, H.W., O'Meara, T.J., Egerton, J.R., Lehrbach, P.R., Schwartzkoff, C.L., 1994. Protective antibody titres and antigenic competition in multivalent Dichelobacter nodosus fimbrial vaccines using characterised rDNA antigens. Vet. Immunol. Immunopathol. 40, 253–274. http://dx.doi.org/10.1016/0165-2427(94)90024-8.
Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R., Stewart, D.J., Lehrbach, P.R., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., 1993. The effects of antigenic-competition on the efficacy of multivalent footrot vaccines. Aust. Vet. J. 70, 123–126.
Steinman, A., Galon, N., Arazi, A., Bar-Giora, Y., Shpigel, N.Y., 2007. Cattle immune response to botulinum type D toxoid: results of a vaccination study. Vaccine 25, 7636–7640.
Troxel, T., Burke, G., Wallace, W., Keaton, L., Mcpeake, S., Smith, D., Nicholson, I., 1997. Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. J. Anim. Sci. 75, 19–25.
U.S. Government Publishing Office, 2017. eCFR - Code of Federal Regulations [WWW Document]. URL. http://www.ecfr.gov/cgi-bin/ECFR?page=browse.
Uzal, F.A., 2012. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against clostridium chauvoei infection in cattle. Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract. 28, 71–77. http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.12.006.
Uzal, F.A., Bodero, D.A., Kelly, W.R., Nielsen, K., 1998. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial Clostridium perfringens epsilon toxoid vaccine. Vet. Rec. 143, 472–474.
Webster, A.C., Frank, C.L., 1985. Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbits and guinea pigs by the administration of multicomponent clostridial vaccines. Aust. Vet. J. 62, 112–114.