

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN DE UN BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE  
TRANSPORTADOR DE UN PÉPTIDO INMUNOGÉNICO DEL  
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y EVALUACIÓN DE LA  
RESPUESTA INMUNE EN RATONES INMUNIZADOS**

**JOSÉ EMILIO MÉNDEZ SCOLARI**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Biotecnología

San Lorenzo – Paraguay  
Enero – 2021

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN DE UN BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE  
TRANSPORTADOR DE UN PÉPTIDO INMUNOGÉNICO DEL  
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y EVALUACIÓN DE LA  
RESPUESTA INMUNE EN RATONES INMUNIZADOS**

**JOSÉ EMILI MÉNDEZ SCOLARI**

Orientador: **Prof. Dr. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES**  
Co-Orientadora: **Prof. Dra. PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Biotecnología

San Lorenzo – Paraguay  
Enero – 2021

**Méndez Scolari, José Emilio .**

**Producción de un bacteriófago recombinante transportador de un péptido inmunogénico del virus de la fiebre aftosa y evaluación de la respuesta inmune en ratones inmunizados / José Emilio Méndez Scolari . - - San Lorenzo: El autor, 2021.**

**XII, 65 p.: fig.; 30 cm.**

**Tesis presentada a la Dirección General de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, mención Biotecnología.**

**1. FAGOS FILAMENTOSOS 2. VACUNA RECOMBINANTE. 3. FMDV I.  
Título**

**CDD: 660.6  
M538p**

**PRODUCCIÓN DE UN BACTERIÓFAGO RECOMBINANTE  
TRANSPORTADOR DE UN PÉPTIDO INMUNOGÉNICO DEL  
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA Y EVALUACIÓN DE LA  
RESPUESTA INMUNE EN RATONES INMUNIZADOS**

**JOSÉ EMILIO MÉNDEZ SCOLARI**

Aprobado en fecha 20 de enero del 2021

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Derlis Ibarrola	FCQ/UNA
Prof. Dr. Miguel Campuzano	FCQ/UNA
Prof. Dra. Cristina Romero	FCQ/UNA
Dra. Eva Nara	IICS/UNA

Prof. Dr. Pablo Sotelo  
Orientador

Prof. Dra. Patricia Langjahr  
Co-Orientadora

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez  
Directora de Postgrado

## **DEDICATORIA**

A mi familia, amigos, compañeros y profesores. Sin quienes no hubiera sido posible este gran logro.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, tanto a mis padres como a mis hermanos, por el constante apoyo en mi formación académica y profesional.

Al CONACYT, entidad financiadora tanto de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas como del proyecto PINV15-224, en cuyo marco fue realizado esta tesis. Por la confianza depositada al otorgarme la beca que permitió la realización de esta maestría.

A FUNDAQUIM, por el apoyo en la gestión del proyecto PINV15-224.

A la FCQ-UNA, institución donde he sido formado ya desde la carrera de Bioquímica, por el espacio y las oportunidades brindadas

Al departamento de Farmacología de la FCQ-UNA, por el trabajo conjunto para la realización de los experimentos que permitieron la obtención de los distintos resultados de esta tesis. En especial a la Prof. Dra. Yenny Montalveti, quien me ha transmitido los conocimientos prácticos y teóricos necesarios para la realización de los ensayos en animales de laboratorio.

Al departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, lugar donde fue desarrollada esta tesis. Por haber generado un espacio de crecimiento científico. En especial a mis tutores, el Prof. Dr. Pablo Sotelo y la Prof. Dra. Patricia Langjahr, por haber depositado su confianza en mí y por haberme guiado en el ámbito de la ciencia.

Al plantel docente de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas, por la calidad en la enseñanza.

A mis compañeros y amigos, quienes en varios momentos han sido motivo de fuerza y crecimiento.

A Dios.

**PRODUCCIÓN DE UN BACTERIOFAGO RECOMBINANTE  
TRANSPORTADOR DE UN PÉPTIDO INMUNOGÉNICO DEL VIRUS DE  
LA FIEBRE AFTOSA Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN  
RATONES INMUNIZADOS**

Autor: JOSÉ EMILIO MÉNDEZ SCOLARI

Orientador: PROF. DR. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

Co-Orientadora: PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO

## **RESUMEN**

La fiebre aftosa (FMD, por sus siglas en inglés) es una enfermedad que afecta a animales domésticos y silvestres de pezuña hendida y es causada por el virus de la fiebre aftosa (FMDV). Esta enfermedad genera grandes pérdidas económicas en el sector ganadero, principalmente en países como Paraguay. Las vacunas anti-aftosa actuales presentan algunas limitaciones, tales como dificultad en su producción y purificación, requerimientos estrictos de cadena de frío, corta duración en la protección, entre otras. Ante este escenario, el objetivo de este trabajo fue producir fagos filamentosos recombinantes (M13-GHL) que expresen, acoplado a la proteína pVIII de la cápside viral, el epítipo inmunogénico GHL (GH loop) de la proteína VP1 y evaluar la respuesta inmune en ratones inmunizados con el mismo. Se obtuvieron fagos recombinantes, con el péptido GHL expresado en la superficie del fago y este péptido fue reconocido por un anticuerpo anti-FMDV, sugiriendo una conformación nativa. Además, la inmunización de ratones con  $1 \times 10^{12}$  fagos, fue segura y logró inducir respuesta inmune tanto humoral como celular contra el FMDV. La respuesta de anticuerpos, evaluada por ensayo de ELISA, se caracterizó por un predominio de anticuerpos IgG1 por sobre IgG2a, lo que sugiere una respuesta del tipo Th2 predominante. Con respecto a la respuesta inmune celular, se observó la proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados con M13-GHL específica contra FMDV. Como conclusión, estos resultados en conjunto demuestran el potencial de los fagos filamentosos recombinantes como alternativa para la producción de vacunas contra el FMDV.

Palabras claves: FMDV, vacuna recombinante, fagos filamentosos, *phage display*

**PRODUCTION OF A RECOMBINANT BACTERIOPHAGUS  
TRANSPORTING AN IMMUNOGENIC PEPTIDE OF FOOT-AND-MOUTH  
DISEASE VIRUSES AND EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN  
IMMUNIZED MICE**

Author: JOSÉ EMILIO MÉNDEZ SCOLARI

Advisor: PROF. DR. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

Co-advisor: PATRICIA ELENA LANGJAHR PENAYO

**SUMMARY**

Foot and mouth disease (FMD) is a cloven-hoofed disease that affects domestic and wild animals and is caused by the foot-and-mouth disease virus (FMDV). This disease generates great economic losses in the livestock sector, mainly in countries like Paraguay. FMD vaccines present some limitations, such as difficulty in their production and purification, strict cold chain requirements, short duration of protection, among others. Given this scenario, the objective of this work was to produce recombinant filamentous phages (M13-GHL) that express, coupled to the pVIII protein of the viral capsid, the immunogenic epitope GHL (GH loop) of the VP1 protein and evaluate the immune response in mice immunized with the same. Recombinant phages were obtained, with the GHL peptide expressed on the surface of the phage and this peptide was recognized by an anti-FMDV antibody, suggesting a native conformation. In addition, the immunization of mice with  $1 \times 10^{12}$  phages was safe and produced both humoral and cellular immune responses against FMDV. The antibody response, evaluated by ELISA assay, was characterized by a predominance of IgG1 antibodies over IgG2a, suggesting a predominant Th2-type response. Regarding the cellular immune response, the proliferation of splenocytes of mice immunized with M13-GHL specific against FMDV is found. In conclusion, these results together show the potential of recombinant filamentous phage as an alternative for the production of vaccines against FMDV.

Keywords: FMDV, recombinant vaccine, filamentous phages, phage display

## ÍNDICE

1	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Fiebre aftosa .....	1
1.2	FMDV .....	3
1.2.1	Estructura .....	3
1.2.2	Ciclo replicativo .....	5
1.2.3	Estructura genómica.....	6
1.2.4	Vacunas contra FMDV .....	7
1.2.5	Sitio GHL como inmunógeno. ....	9
1.3	Fagos filamentosos .....	9
1.4	Phage display.....	11
1.5	Fagos filamentosos y respuesta inmune .....	12
1.6	, Fagos filamentosos y vacunas recombinantes .....	13
1.7	Vacunas antivirales de fagos filamentosos.....	15
2	OBJETIVOS .....	17
2.1	Objetivo General .....	17
2.2	Objetivos Específicos .....	17
3	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
3.1	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> ER2738 con el plásmido GHL .....	18
3.2	Extracción de ADN plasmídico y análisis con enzimas de restricción .....	19
3.3	Producción y purificación de bacteriófagos .....	19
3.4	Cuantificación de fagos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	20
3.5	Obtención de antígeno vacuna.....	21
3.6	Análisis de expresión del antígeno GHL por <i>dot blot</i> .....	21
3.7	Análisis de expresión del antígeno GHL por ELISA .....	22
3.8	Inmunización de ratones.....	22
3.9	Evaluación de la respuesta inmune humoral .....	23
3.10	Análisis de la respuesta celular .....	24
4	RESULTADOS.....	26
4.1	Obtención de bacterias ER2738 transformadas.....	26
4.2	Fago recombinante M13-GHL .....	27

4.3	Inmunización de ratones.....	28
4.4	Respuesta inmune humoral .....	32
4.5	Respuesta inmune celular .....	36
5	DISCUSIÓN .....	43
6	CONCLUSIONES .....	51
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
1 Estructura del FMDV y unión del GHL a la integrina	4
2 Ciclo de replicación del FMDV	6
3 Organización del genoma del FMDV	7
4 Estatus actual de la fiebre aftosa en los países miembros de la OIE	8
5 Estructura de los bacteriófagos filamentosos	10
6 Exposición de péptidos exógenos en la superficie del fago por phage display	11
7 Componentes del gen sintético GHL-pVIII	25
8 Presencia del gen sintético en los clones transformados	26
9 Presencia del antígeno recombinante en la superficie de M13-GHL	27
10 ELISA con fagos recombinantes	28
11 Respuesta humoral a M13KO7	29
12 Inmunización de ratones con M13-GHL	31
13 Gráfico de supervivencia de ratones inoculados con fagos	32
14 Respuesta de anticuerpos anti-Fago en ratones inmunizados	33
15 Anticuerpos anti-FMDV en suero de ratones inmunizados	34
16 Respuesta de anticuerpos de isotipo IgG1	35
17 Respuesta de anticuerpos de isotipo IgG2a	36
18 Proliferación de esplenocitos inducidos con ConA	37
19 Proliferación de esplenocitos bajo distintos estímulos de mitógenos	39
20 Esquema de inoculación para ensayo de proliferación de esplenocitos	40
21 Proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados	42

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AgV	Antígeno de vacuna comercial de anti-aftosa
AUG	Adenina-Uracilo-Guanina
BEI	Etilenimina binaria
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Células dendríticas
ConA	Concanavalina A
CpG	Citosina fosfato guanosina oligodesoxinucleótido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
FMD	Fiebre aftosa
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
GHL	Bucle GH
HBV	Virus de la hepatitis B
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M13-GHL	Fago recombinante que expresa GHL
M13KO7	Fago filamentoso silvestre
mAb99	Anticuerpo monoclonal anti GHL
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
OD	Densidad óptica
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	Marco abierto de lectura
PEG	Polietilenglicol
PHA	Fitohemaglutinina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RGD	Arginina-glicina-aspartato
spi	Semanas post inoculación
ssDNA	ADN de simple hebra
TBS	Tris Buffer Salino
Th	Linfocitos T colaboradores
TLR	Receptor tipo Toll

UNA	Universidad Nacional de Asunción
UTR	Región no traducida
VGC	Copias de genoma viral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 Fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FMD) es una enfermedad viral que afecta tanto animales domésticos como salvajes de pezuña hendida, su alto carácter contagioso la posiciona entre las principales afecciones ganaderas de importancia a nivel mundial, es así que las regiones endémicas contienen tres cuartas partes de toda la población mundial de ganado susceptible a esta enfermedad (Knight-Jones et al., 2017; Knight-Jones & Rushton, 2013a). El agente causal de esta enfermedad es el FMDV, perteneciente al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*, que básicamente consiste en un genoma de ARN monocatenario de cadena positiva con 8500 bases, envuelto por cuatro proteínas estructurales que conforman la cápside icosaédrica que presenta dicho virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV*; Racaniello, 2007).

El FMDV se divide principalmente en siete serotipos (A, C, O, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), de los cuales tres se encuentran presentes en Sudamérica (A, C, O). La infección con un determinado serotipo no protege al animal contra cualquiera de los demás serotipos (Naranjo & Cosivi, 2013). En ganado bovino este virus se transmite principalmente por vía respiratoria a través de aerosoles, otra forma menos eficiente de transmisión es través de ulceraciones en la piel o las membranas mucosas. Se ha visto que luego de la exposición controlada al virus por aerosoles ocurre una infección primaria en las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea, para luego diseminarse a través de tracto respiratorio, desencadenando finalmente una viremia y enfermedad generalizada (Arzt et al., 2010; Pacheco et al., 2010).

Los animales que contraen esta enfermedad presentan fiebre de corta duración; lesiones epiteliales en la lengua, encías y áreas internas de la boca, lo que lleva a una salivación excesiva y babeo; las lesiones también pueden presentarse en las zonas interdigitales de las pezuñas, lo cual produce una cojera en el animal. Además, produce pérdidas de peso, disminución en la producción de leche y pérdida en la potencia de tracción, lo cual se traduce en una disminución en la productividad y pérdida económica en el rubro de la ganadería (Brooksby, 1982; James & Rushton, 2002). La gravedad con la que se podrían presentar los signos y síntomas depende de varios factores tales como la cepa viral, la especie del animal, la dosis de exposición y el estado inmunitario del huésped, siendo la mortalidad relativamente baja en los animales adultos y alta en los animales jóvenes (OIE, 2013).

Aproximadamente el 77% de la población mundial de ganado correspondiente a las zonas de África, Oriente Medio, Asia y algunas zonas delimitadas de América del Sur presentan FMDV en circulación, lo que conlleva a una amenaza permanente de esta enfermedad en los países libres de aftosa presente en estas zonas (OIE, 2020a). Estas características hacen que la FMD tengan un gran impacto mundial, a pesar de ser una enfermedad con baja mortalidad, ya que infecta una gran cantidad de animales susceptibles. El impacto económico de esta enfermedad se debe tanto a la pérdida de producción ganadera como a la pérdida causada por los costos que conlleva el control de la enfermedad (Knight-Jones & Rushton, 2013b). En una publicación del 2013 se estimó un gasto aproximado de 6,5 a 21 billones de dólares por año en pérdidas de producción y gastos por vacunación. Por otro lado, los brotes de esta enfermedad en los países libres de aftosa causan una pérdida de más de 1,5 billones de dólares al año (Knight-Jones & Rushton, 2013b).

Como dato relevante, un informe publicado en el año 2012 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), afirma que el último brote de FMD en Paraguay generó una pérdida de 50.000 puestos de trabajo, mil millones de dólares en inversión quedaron sin efecto y aproximadamente el 29% de las exportaciones de carne disminuyeron, lo que demuestra que esta enfermedad es un problema devastador en términos sanitarios y socioeconómico bajo condiciones no controladas (FAO, 2012). En el 2019 Paraguay ocupó el puesto 11 como exportador

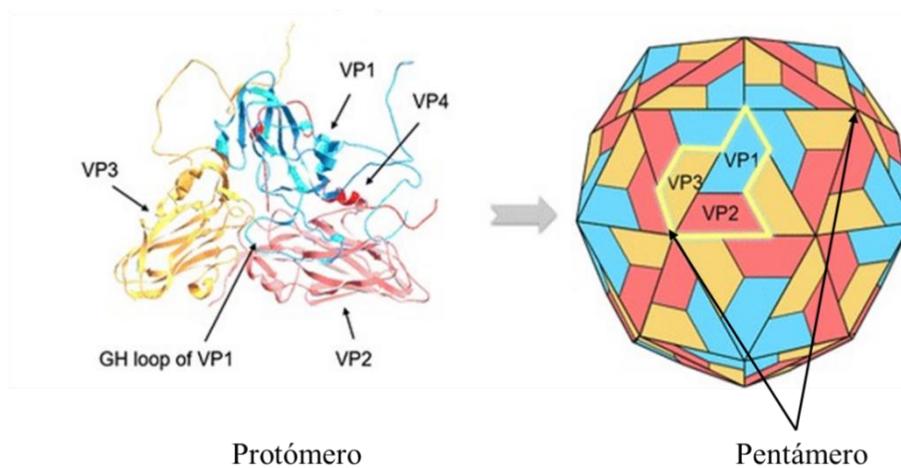
de carne a nivel mundial, siendo la ganadería uno de los principales rubros económicos de nuestro país (Meador & Balbi, 2019). Estos datos ponen en evidencia la importancia de la vacunación en el control de la enfermedad no solo a nivel regional, sino que también a nivel global.

## 1.2 FMDV

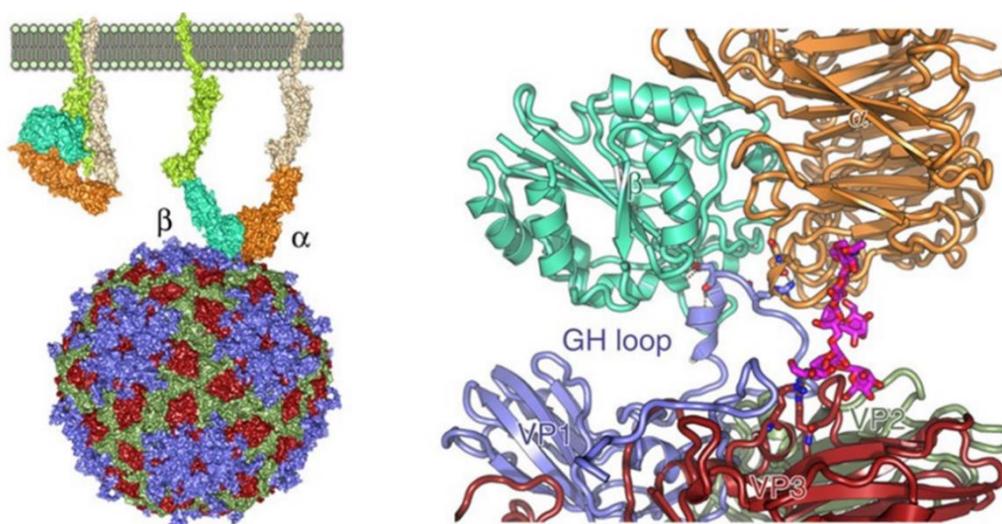
### 1.2.1 Estructura

El FMDV es un virus sin envoltura cuya cápside posee una simetría icosaédrica, dándole un aspecto aproximadamente esférico, con un diámetro que ronda entre los 25 a 30 nm (Jamal & Belsham, 2013). Dicha cápside está compuesta por 60 copias de las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4. La estructura de la cápside está formada por 12 copias de un pentámero compuesto a su vez por cinco copias de un protómero formado por una copia de cada una de las cuatro proteínas estructurales del FMDV (**Figura 1.A**) (Acharya et al., 1989; Fry et al., 2005). En esta estructura, a excepción de la proteína VP4 que se encuentra hacia la cara interna de la cápside, las tres proteínas estructurales restantes están expuestas en la superficie viral (Acharya et al., 1989). La proteína VP1 es la principal responsable de la unión del virus a su célula huésped, ya que contiene en su estructura un sitio denominado *GH loop* (GHL) ubicado entre los aminoácidos 140 y 160, y que a su vez contiene un motivo RGD (arginina-glicina-aspartato) que permite la unión del virus a la célula huésped, mediante receptores de integrina (**Figura 1.B**) (Kotecha et al., 2017).

A



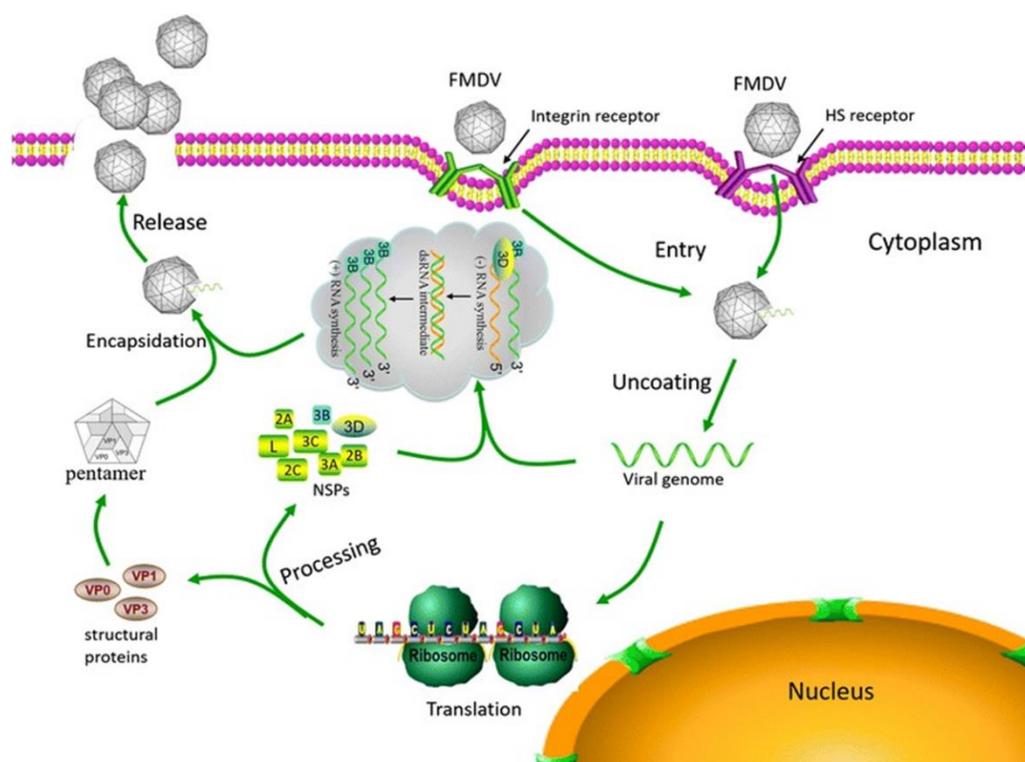
B



**Figura 1. Estructura del FMDV y unión del GHL a la integrina. A.** Conformación de las cuatro proteínas estructurales en la cápside del FMDV. Extraído de Gao, Sun, & Guo, (2016). **B.** Unión del FMDV a la célula huésped a través de la interacción del RGD de del sitio GHL de la proteína VP1 con las integrinas. Extraído de Kotecha *et al.*, (2017).

### 1.2.2 Ciclo replicativo

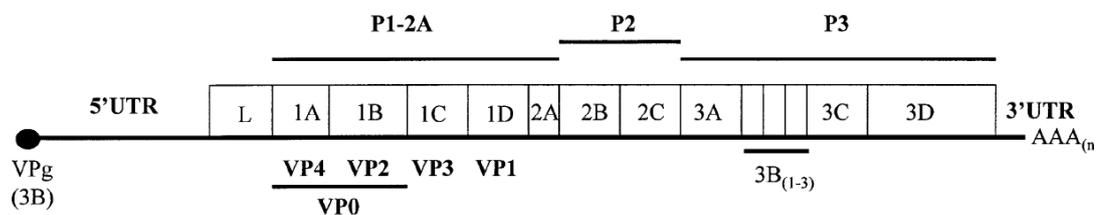
La unión del motivo RGD del bucle GHL de la proteína VP1 a integrinas, constituye el primer paso que inicia la infección del FMDV (V O'Donnell et al., 2009).  $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 6$  y  $\alpha\nu\beta 8$  son las 4 integrinas identificadas en forma *in vitro* a las cuales el FMDV puede unirse durante la infección, siendo la integrina  $\alpha\nu\beta 6$  la que posee una más alta afinidad por el FMDV (Berryman et al., 2005; Kotecha et al., 2017). Además de las integrinas, los receptores de heparán sulfato también funcionan como punto de entrada del virus a la célula, de esta manera, de acuerdo al receptor utilizado se produce la internalización viral en la célula hospedera a través de endocitosis mediada por clatrina en el caso de integrinas, o caveolina para los heparán sulfato (Martín-Acebes et al., 2007; Vivian O'Donnell et al., 2008). Una vez que el virus es internalizado, la acidificación de los endosomas posibilita la liberación del material genético al citosol, para luego iniciar el proceso de traducción gracias a la presencia del IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), llevando a la producción de la poliproteína, la cual es escindida para dar las distintas proteínas tanto estructurales como no estructurales, paralelamente el genoma es replicado por acción de la polimerasa viral 3Dpol (Belsham, 2005). El ciclo viral finaliza con la encapsidación del ARN genómico viral y la posterior maduración de la cápside, de esta manera el virus recién ensamblado es liberado a través de una lisis celular (**Figura 2**) (Grubman & Baxt, 2004).



**Figura 2. Ciclo de replicación del FMDV.** Unión a receptores, entrada, replicación, ensamblaje y liberación de partículas virales del FMDV. Extraído de Gao *et al.*, (2016)

### 1.2.3 Estructura genómica

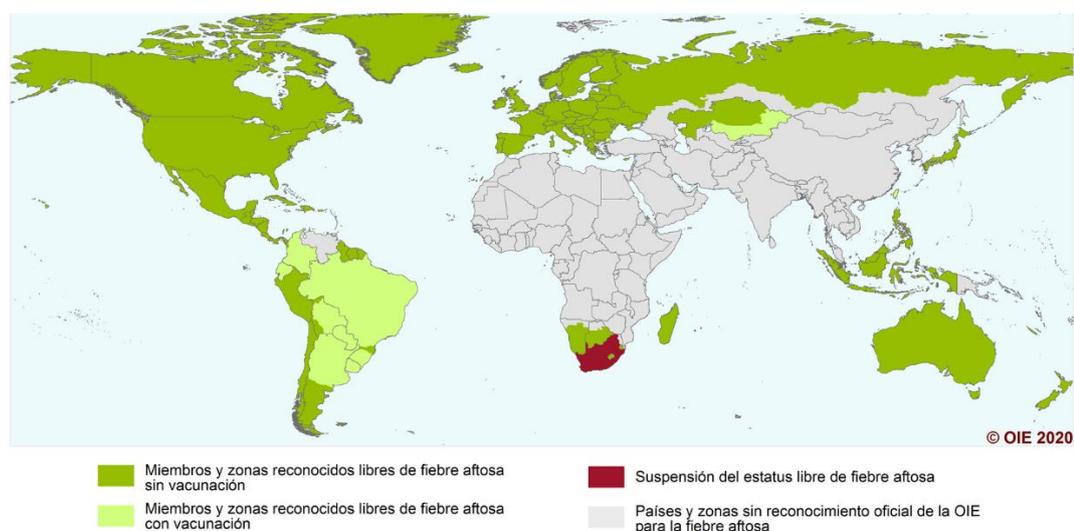
El genoma del FMDV se divide principalmente en una región 5'UTR, un ORF que posee dos codones AUG alternativos que lleva a la generación de una poliproteína de unos 2300 aminoácidos que luego de ser procesada por proteasas virales genera las distintas proteínas virales, y por último una región 3'UTR (Belsham, 2005). Los productos finales generados a partir de la poliproteína consisten en cuatro proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y ocho proteínas no estructurales (Lpro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3Cpro y 3Dpol) (**Figura 3**) (Belsham, 2005).



**Figura 3. Organización del genoma del FMDV.** VPg: proteína codificada por la región 3B, unida covalentemente al extremo 5' del genoma; UTR: región no traducida; L: proteína líder; 1A, 1B, 1C, 1D: genes correspondientes a las proteínas estructurales VP4, VP2, VP3 Y VP1 respectivamente; 2A, 2B, 2C, 3B, 3C, 3D: genes de proteínas no estructurales; P1-2A, P2, P3: poliproteínas precursoras. Extraído de Belsham, (2005).

#### 1.2.4 Vacunas contra FMDV

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la FAO lanzaron la *Estrategia Mundial de Control de la FMD*, en la cual, se incluyen campañas de vacunación como parte de la medida, definiendo las zonas o países libres de aftosa en dos posibles categorías: “libre sin vacunación” o “libre con vacunación”. Esta diferenciación se debe principalmente a que las vacunas actualmente utilizadas para esta enfermedad presentan contaminaciones con proteínas no estructurales, lo cual dificulta distinguir los animales vacunados de los animales infectados, siendo así una barrera económica para los países libres con vacunación a la hora de exportar sus productos a los países libres sin vacunación (Clavijo et al., 2017; Doel, 2003; FAO and OIE; Animal Production and Health Division, 2012). En Sudamérica, alrededor del 77% de la superficie libre de aftosa corresponde a la categoría “libre con vacunación” (incluyendo a Paraguay en esta categoría) (Clavijo et al., 2017) (**Figura 4**).



**Figura 4. Estatus actual de la fiebre aftosa en los países miembros de la OIE.** Distribución mundial de los países y zonas que forman parte del plan de control de fiebre aftosa de la OIE y sus correspondientes estatus actuales. Extraído de OIE, (2020).

A pesar de los años de investigación en vacunas contra el FMD, el inmunógeno básico usado para su formulación no presenta mayores cambios en los últimos 40 años, estas vacunas en su mayoría son generadas por amplificación de la cepa virulenta de FMDV correspondiente en células BHK-21, los virus amplificados son inactivados con etilenimina binaria (BEI), y luego de una purificación, son formulados utilizando adyuvantes correspondientes (Rodriguez & Grubman, 2009; Zhang et al., 2011). A parte del problema de contaminación con proteínas no estructurales, ya mencionado anteriormente, esta vacuna posee los inconvenientes de que para mantener la inmunidad se necesitan refuerzos periódicos; demanda una estricta cadena de frío por su termolabilidad; para su producción se necesita de instalaciones de alta bioseguridad y contención, ya que existen antecedentes de brotes por liberación involuntaria del virus; por último, existen dificultades para obtener este tipo de vacunas con las cepas no adaptadas a cultivo (Cottam et al., 2008; Doel, 2003). En regiones endémicas, como África, los serotipos circulantes poseen una alta variabilidad antigénica, lo que implica una constante reformulación de las vacunas de acuerdo a la cepa circulante (Rweyemamu et al., 2014). Para el desarrollo de nuevas cepas vacunales de virus inactivados es necesario obtener altos rendimientos en los cultivos celulares en términos replicación viral y producción antigénica, lo que se traduce en procesos que

permitan la adaptación de las nuevas cepas a los cultivos celulares de producción. Además del costo, estos procesos podrían requerir tiempo, el cual es un factor de gran importancia para el control de los brotes durante una emergencia (Maree et al., 2010; Rweyemamu et al., 2014).

Ante lo anteriormente expuesto es necesario el desarrollo de nuevas vacunas, que permitan la distinción de animales vacunados de infectados y que además sean termoestables y fáciles de producir.

### **1.2.5 Sitio GHL como inmunógeno.**

El GHL se caracteriza por ser uno de los epítomos de células B mayormente reconocido por anticuerpos en el FMDV (Tang et al., 2012), y con gran capacidad para la generación de anticuerpos neutralizantes (Cheung et al., 1983; Fox et al., 1989). El motivo RGD presente en este sitio se encuentra altamente conservado entre los diferentes serotipos del FMDV, y estructuralmente se encuentra situada en la parte superior del bucle formado en el GHL (Burman et al., 2006). Tanto la proteína VP1 como el sitio GHL, son muy estudiadas para el diseño de vacunas contra el FMDV direccionadas a la obtención de una respuesta inmune capaz de neutralizar la entrada del virus a la célula huésped (Blanco et al., 2013; H.-B. Lee et al., 2017; C. Y. Wang et al., 2002b).

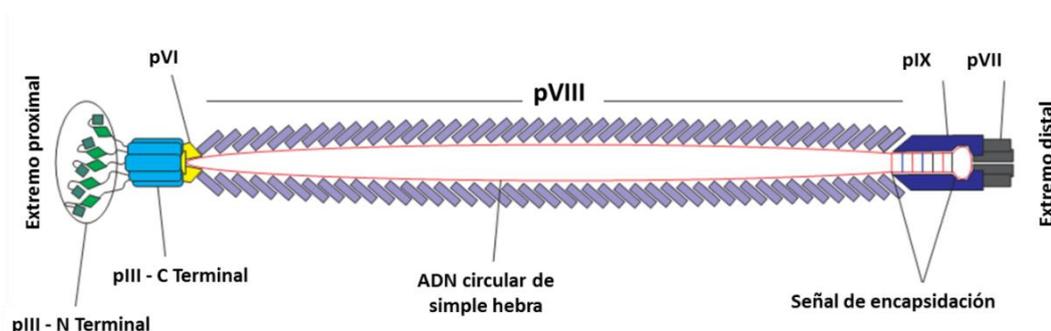
Más aún, varios trabajos han demostrado la capacidad de producir protección contra el FMDV cuando animales de distintas especies son inmunizados con este sitio antigénico (Bittle et al., 1982; Fischer et al., 2003; Pfaff et al., 1982). Un dato relevante sobre el uso del GHL como inmunógeno es la vacuna comercial basada en péptido sintético (UBITh®-VP1), que fue desarrollada por *United Biomedicals*, y aprobada para su uso en cerdos en Taiwán y China Continental (Y. Cao et al., 2016; C. Y. Wang et al., 2002a, 2004).

### **1.3 Fagos filamentosos**

Los bacteriófagos que pertenecen a la familia *Inoviridae*, llamados comúnmente fagos filamentosos, infectan principalmente a bacterias Gram negativas (Marvin et al., 2006;

Sharma et al., 2017). Existe un grupo de bacteriófagos filamentosos pertenecientes al género *Inovirus*, caracterizados porque infectan específicamente a bacterias *Escherichia coli* que expresan F-pili (fagos Ff), y está compuesto por los virus M13, fd, f1 y ZJ/2. De éstos, los fagos M13, fd y f1 son los más estudiados y tienen una similitud genómica de 98,5% (Bayer & Bayer, 1986; Calendar & MyiLibrary., 2006).

En términos estructurales estos fagos pueden ser descritos como un nanotubo compuesto por una nucleoproteína filamentososa semi-flexible de aproximadamente 880 nm de largo, 6,6 nm de diámetro, en cuyo interior se encuentra su genoma, una molécula de ADN circular de simple hebra. (Bennett et al., 2011). La cápside se encuentra conformada por una proteína principal con forma de espiral, llamada pVIII, que recubren longitudinalmente al fago, superponiéndose varias copias del mismo de manera helicoidal, el número de copias de esta proteína depende del tamaño del fago oscilando alrededor de 2700 copias en el fago silvestre. En sus extremos se encuentran las proteínas estructurales menores, pVI y pIII por un lado, pVII y pIX por el otro (Figura 5) (Marvin et al., 2014).



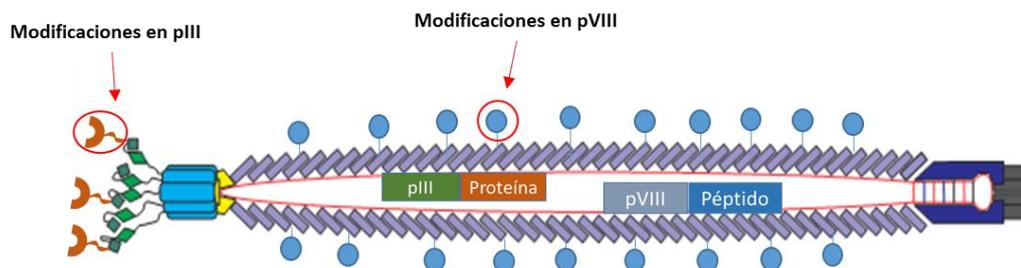
**Figura 5. Estructura de los bacteriófagos filamentosos.** Componentes estructurales de la cápside del bacteriófago filamentosos M13.

La proteína pIII reconoce en forma específica la estructura F-pilus presente en la bacteria *E. coli*, estructura por el cual se introducirá el material genético del virus. Cuando el ADN circular de simple hebra se encuentra dentro del huésped, utiliza la maquinaria enzimática del mismo para transformarse a la forma replicativa, que consiste en un ADN de doble hebra, a partir de esta forma replicativa se inicia la transcripción produciéndose los ARN mensajeros que codifican para las distintas proteínas del bacteriófago. A su vez, utilizando como templado la forma replicativa

del ADN, se van formando copias de ADN de simple hebra (ssDNA) por un mecanismo de replicación continua en círculo rodante. Una vez que las concentraciones de proteínas virales sean suficientes, ocurre la incorporación de la del material genético a la partícula viral a través de un complejo de encapsidación viral que se forma en la membrana bacteriana. Finalmente, el ensamble comienza con la adición de las proteínas virales pVII y pIX, de esta manera, a medida que el fago va saliendo a través de la membrana bacteriana, se va adhiriendo pVIII a lo largo del genoma, el proceso finaliza con el agregado de las proteínas pIII y pVI, la partícula es liberada por la acción de la proteína pIII (Smeal et al., 2016). Cabe resaltar que este proceso ocurre sin comprometer la viabilidad de la célula huésped

#### **1.4 Tecnología *Phage display***

El genoma relativamente sencillo del fago filamentoso, su modo de replicación y empaquetamiento, hacen posible su fácil manipulación genética, permitiendo su uso en una tecnología cuyo nombre en inglés es *Phage Display* (exposición en bacteriófagos). Esta tecnología fue desarrollada por primera vez utilizando el fago *Escherichia virus M13*, y consiste principalmente en la utilización de técnicas de biología molecular para fusionar una secuencia de ADN que codifica un péptido foráneo de interés con el gen que codifica para una proteína del fago. De esta forma al ensamblarse la cápside viral, el péptido foráneo se expone unido a la correspondiente proteína en la cubierta viral en su superficie. Los genes fusionados o editados también pueden incorporarse al genoma durante el ensamble en las siguientes generaciones de fagos, así el genotipo de la partícula viral corresponde al fenotipo (**Figura 6**) (Sidhu, 2000).



**Figura 6. Exposición de péptidos exógenos en la superficie del fago por *phage display*.** Proteínas estructurales del fago más utilizadas en *phage* tanto para la presentación de péptidos (en la proteína pVIII) así como de proteínas pequeñas (en la proteína pIII). El fago ensamblado puede incorporar el fagómido que contiene los genes de las proteínas de fusión.

*Phage Display* es una herramienta muy utilizada en bioingeniería y biomedicina, presentando numerosas aplicaciones tales como tamizaje de bibliotecas de péptidos para la búsqueda de marcadores tumorales y desarrollo de anticuerpos recombinantes (J. Cao, 2000; L. Wang et al., 2016), identificación de proteínas inmunogénicas para su uso potencial en la creación de vacunas contra enfermedades infecciosas (Becker et al., 2015), o para la investigación de otros péptidos específicos de células o tejidos (Israel, 1985; Wu et al., 2016); transporte de quimioterapéuticos a sitios diana específicos, eliminando de esta manera la distribución indiscriminada del quimioterapéutico en el organismo (Bar et al., 2008); construcción de biosensores ópticos en búsqueda de una mayor sensibilidad (Kim et al., 2016).

### 1.5 Fagos filamentosos y respuesta inmune

Los fagos filamentosos son altamente inmunogénicos; éstos pueden ser procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos (Liebert et al., 2003). Su presentación a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) de clase II desencadena una serie de respuestas que conllevan a la activación de los linfocitos T colaboradores (Th, por sus siglas en inglés) tales como Th1, Th2 y Th17, quienes por su parte median y direccionan la activación de otras células inmunes encargadas de producir una respuesta efectora (Liebert et al., 2003; Olivieri et al., 2008; Y. Wang et al., 2014a; Yang et al., 2005). Por otro lado, se ha visto que la presentación de antígenos a través de la molécula MHC de clase I también constituye

un mecanismo a través del cual las proteínas de los fagos filamentosos pueden desencadenar una respuesta inmune (Liebert et al., 2003; Pozzo et al., 2010; Wan et al., 2005).

Otro factor que contribuye a las características inmunogénicas del fago filamentosos constituyen los motivos CpG (citosina fosfato guanosa oligodesoxinucleótido), potentes activadores de la inmunidad tanto innata como adaptativa. Éstos son reconocidos por TLR 9, receptores presentes en las células dendríticas (CD) y otras células inmunes (Shah et al., 2003). Así, la simple hebra de ADN que conforma el material genético de estos fagos posee motivos CpG que actúan como adyuvantes inmuno-moduladores capaces de interactuar con TLR de las CD (Akira et al., 2010).

Las múltiples copias de la proteína principal pVIII constituyen el antígeno dominante en la respuesta a anticuerpos sobre tres de las cuatro proteínas estructurales menores presentes en este fago, siendo la excepción, la pIII. La respuesta a anticuerpos dirigida contra pVIII está restringida a los doce residuos N terminales, en tanto para la pIII la respuesta es causada principalmente por sus dominios externos (Kneissel et al., 1999; Van Hauten et al., 2006). Más específicamente, se ha determinado por microscopía electrónica que anticuerpos específicos se unen de manera uniforme a lo largo de la cápside viral, encontrando que los primeros nueve aminoácidos de la proteína pVIII contribuyen de manera esencial para el reconocimiento de estos anticuerpos (Kneissel et al., 1999).

## **1.6 Fagos filamentosos y vacunas recombinantes**

Debido a la alta inmunogenicidad de los fagos filamentosos, la tecnología *phage display*, constituye una alternativa innovadora para la generación de vacunas recombinantes. Para ello se expresan proteínas pequeñas y péptidos acoplados a las proteínas de la cápside en la superficie de bacteriófagos.

Algunas características de los bacteriófagos que impulsaron su utilización como vectores transportadores en vacunas, se basan en que intrínsecamente estos virus pueden generar una respuesta inmune, pudiendo actuar como un adyuvante para el péptido o proteína inmuno-específica expresada en su superficie (van Houten et al.,

2010). Otra característica atractiva representa el hecho de que son relativamente fáciles de modificar genéticamente y de producir, además de que poseen la capacidad de resistir condiciones físico-químicas relativamente adversas (Aghebati-Maleki et al., 2016a).

En cuanto al tamaño de los fagos filamentosos y su naturaleza particulada, se encuentra en un rango que facilita la presentación cruzada, por lo que poseen notables efectos en la captación y procesamiento de antígeno por el sistema inmune (Bachmann & Jennings, 2010). Una característica peculiar de los fagos filamentosos que los posiciona ventajosamente frente a otros bacteriófagos utilizados en *phage display*, es que la longitud del mismo es variable de acuerdo al tamaño del ADN empaquetado como genoma, esto debido a que la proteína principal pVIII puede adaptarse acomodándose longitudinalmente alrededor del genoma de simple hebra sin alterar el diámetro de la partícula viral (Bakhshinejad et al., 2015).

Las proteínas de la cápside viral de los fagos filamentosos más comúnmente utilizadas para ser modificadas son la proteína principal pVIII y la proteína menor pIII (**Figura 1.B**). De acuerdo con las necesidades estratégicas, puede ser utilizada una u otra proteína, o inclusive ambas. La proteína pVIII permite expresar varios péptidos, con la limitante de que no se pueden presentar antígenos de gran tamaño (Henry et al., 2015). En contraste, la pIII permite expresar algunas proteínas pequeñas plegadas (con tamaños mayores a 25 KDa), con la desventaja de que el número de copias será bajo (Henry et al., 2015). Debido a que el número de copias o la cantidad de un antígeno constituye un factor crítico para la activación del sistema inmune, usualmente los péptidos inmunogénicos son acoplados principalmente a la proteína pVIII, permitiendo una presentación antigénica de alta valencia en la superficie de los fagos (Aghebati-Maleki et al., 2016b).

Cuando la totalidad de las proteínas pVIII son modificadas en el genoma del fago, se puede acoplar péptidos de hasta 6 aminoácidos de tamaño, si esto se sobrepasa, podría afectar el empaquetamiento correcto del fago, así como su capacidad infectiva (Malik & Perham, 1996; Perham, 1995). Por otro lado, la presentación tanto de la pVIII quimérica como la pVIII no modificada en el mismo fago, permite la presentación de

antígenos peptídicos con tamaños de hasta 14 a 20 aminoácidos, correspondiendo aproximadamente un 15% de la pVIII total (Perham, 1995).

Estas características condujeron el desarrollo de vacunas contra diferentes blancos, utilizando fagos filamentosos, entre los que se incluyen: virus (Bahadir et al., 2011; Bastien et al., 1997a; Deng et al., 2015a; Grabowska et al., 2000a; Zhong et al., 2011), parásitos (Cui et al., 2013; Rassy et al., 2010; Willis et al., 1993), el péptido AB responsable de la enfermedad de Alzheimer (Frenkel et al., 2000), y diferentes tumores (Fang et al., 2005; Roehnisch et al., 2014; Sartorius et al., 2008).

Se debe resaltar que hay vacunas de fagos que ya son utilizadas en salud animal, tal es el caso de la vacuna basada en un M13 transportador de péptidos inmunogénicos contra *Taenia solium* aplicada en cerdos, la cual se ha distribuido en un programa de control de dicha enfermedad en México (Morales et al., 2008, 2011; Sciutto et al., 2007).

### **1.7 Vacunas antivirales de fagos filamentosos**

Existe una cantidad considerable de vacunas antivirales que utilizan como transportador inmunogénico al fago filamentosos, algunas más eficientes que otras. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fueron diseñadas vacunas de fagos (Chen et al., 2001; Di Marzo Veronese et al., 1994), se ha visto que puede llegar a generar protección en monos infectados con cepas adaptadas (Chen et al., 2001). Además, a través de la presentación de un péptido derivado de la retrotranscriptasa de VIH-1, han logrado establecer una respuesta celular citotóxica efectiva y específica en ratones (De Berardinis et al., 2000).

Varios trabajos han diseñado vacunas de fagos filamentosos contra antígenos de la superficie del virus de la hepatitis B (HBV) (Delmastro et al., 1997; Folgori et al., 1994; Meola et al., 1995; Motti et al., 1994), las cuales mostraron una potente respuesta de anticuerpos. Así también, existen reportes de presentación de antígenos de virus hepatitis C en la superficie de fagos filamentosos (Delmastro et al., 1997; Prezzi et al., 1996; Puntoriero et al., 1998).

Vacunas de fagos filamentosos contra el virus sincitial respiratorio humano, virus del herpes simple tipo 2 y virus de la influenza A, generaron una respuesta inmune protectora en animales modelos (Bastien et al., 1997c; Deng et al., 2015b; Grabowska et al., 2000b). Todos estos trabajos demuestran el potencial que poseen los fagos filamentosos para su utilización en el diseño de vacunas antivirales.

Es importante notar, que los fagos filamentosos son seguros para su aplicación y han sido aprobados por la *Food and Drug Administration* (USA), para su uso en humanos (Hunter, 2011). Existen estudios publicados de fase I/II en humanos donde utilizan el fago M13 con antígenos acoplados químicamente para el tratamiento del linfoma 1 (Roehnisch et al., 2014). Además, estos fagos son altamente estables a temperaturas de hasta 63°C, lo que los hace adecuados para el transporte y almacenamiento a temperatura ambiente (Brigati & Petrenko, 2005).

Todas estas características hacen que la producción de vacunas recombinantes de bacteriófagos filamentosos, a través de la tecnología *phage display*, constituyan una alternativa altamente atractiva para varias enfermedades, incluyendo la FMD.

En este trabajo se produjeron fagos filamentosos M13 recombinantes que expresan, acoplado su proteína pVIII, el péptido antigénico GH1 de la proteína VP1 del FMDV.

Además de producir el fago recombinante, en este trabajo se evaluó la respuesta inmune celular y humoral generada contra el FMDV en ratones inoculados con el bacteriófago recombinante, lo cual constituye el primer paso para el desarrollo de una nueva vacuna para esta enfermedad.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Generar un bacteriófago recombinante transportador de un péptido inmunogénico del virus de la fiebre aftosa capaz de inducir respuesta inmune específica en ratones inmunizados

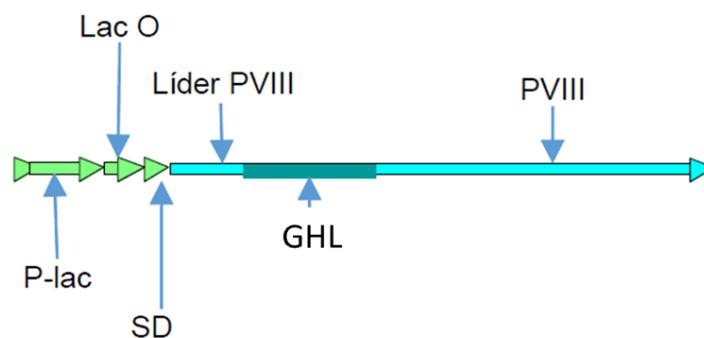
### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obtener bacteriófagos M13 recombinantes que expresen en su superficie el péptido inmunogénico “GH loop” de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa.
- Evaluar la expresión del péptido GH loop en la superficie del fago M13, acoplado a la proteína pVIII.
- Evaluar la respuesta inmune específica generada por la vacuna recombinante en ratones de laboratorio inmunizados.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Gen sintético y plásmido pGHL

Con el fin de obtener un sistema de expresión que pueda suministrar en *trans* el péptido GHL acoplado a la proteína pVIII del fago filamentoso, anteriormente en el laboratorio de Biotecnología de la FCQ-UNA se diseñó el plásmido pGHL. Como se esquematiza en la **Figura 7**, el mismo consiste en un gen sintético con los siguientes componentes respectivamente: promotor lac, operador lac, secuencia Shine Dalgarno, líder pVIII o secuencia de exportación al periplasma de pVIII, secuencia codificante del epítipo GHL fusionada a la secuencia que codifica para la proteína pVIII. Además de todos los componentes ya mencionados, este gen fue sintetizado en un plásmido con un origen de replicación bacteriano, pero carente de origen de replicación viral y señal de empaquetamiento, esto a fin de obtener bacteriófagos recombinantes que expresen en su superficie el péptido GHL, a la vez que empaquetan el genoma correspondiente al fago silvestre M13KO7.



**Figura 7. Componentes del gen sintético GHL-pVIII.** P-lac: promotor lac; Lac O: operador lac; SD: secuencia Shine Dalgarno; Líder pVIII: Secuencia de exportación al periplasma de pVIII; GHL; Epítipo GH Loop; pVIII: Secuencia de la proteína pVIII.

### **3.2 Transformación de bacterias *E. coli* ER2738 con el plásmido GHL**

Bacterias *E. coli* ER2738 fueron transformadas con el plásmido GHL, el cual contiene la proteína quimérica pVIII-GHL. Brevemente, 100  $\mu$ L de bacterias ER2738 competentes fueron incubadas durante 30 minutos en hielo con 100 ng de plásmido GHL, posteriormente, se incubó inmediatamente a 42 °C durante 90 segundos, a continuación fueron incubados en hielo durante 2 minutos. Luego, a cada tubo se le adicionó 900  $\mu$ L de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Por último, 100  $\mu$ L de bacterias transformadas fueron inoculadas en placas con medio LB-Agar y antibiótico ampicilina, la incubación fue a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente, las colonias crecidas en el medio con ampicilina, fueron repicadas e inoculadas en medio LB líquido, luego de incubarlo toda la noche a 37 °C, las bacterias crecidas fueron utilizadas para la extracción de ADN plasmídico y su posterior análisis con enzimas de restricción.

### **3.3 Extracción de ADN plasmídico y análisis con enzimas de restricción**

A partir de los clones transformados con el plásmido pGHL, y crecidos en medio LB líquido, se procedió en primer lugar a realizar una extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina, similar a como se ha descrito anteriormente (Birnboim & Doly, 1979). Seguidamente se realizó cortes con enzimas de restricción para comprobar la presencia del inserto, para ello se utilizaron las enzimas *HindIII* (Invitrogen, USA) y *EcoRI* (Promega, USA). Aproximadamente 1  $\mu$ g de cada plásmido obtenido a partir de los clones de transformados con pGHL fue digerido con las enzimas mencionadas incubando durante 3 horas a 37 °C utilizando un termociclador MultiGene™ (Labnet, USA), el producto de digestión fue visualizado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **3.4 Producción y purificación de bacteriófagos**

Para la producción tanto del fago M13KO7 como del fago recombinante M13-GHL, se utilizó un método de producción a gran escala que se adaptó a partir de métodos de

producción y purificación de fagos por precipitación con polietilenglicol (PEG) ya descritos anteriormente (J. H. Lee et al., 2017; Y. Wang et al., 2014b). Brevemente, el clon de ER2738 transformado correctamente con el plásmido pGHL (o ER2738 sin transformar para la producción de M13KO7) fue reactivado cultivando en medio LB líquido con antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37 °C con agitación a 140 rpm. Posteriormente, a partir del cultivo crecido y reactivado, se inoculó nuevamente en medio LB líquido con antibiótico correspondiente, y se incubó a 37 °C con agitación de 140 rpm, hasta alcanzar un densidad óptica (DO) de entre 0,4 a 0,8, a una longitud de onda de 600 nm, estas bacterias llevadas a DO fueron infectadas con el fago colaborador M13KO7 durante una hora a 37 °C sin agitación. 4 mL de bacterias infectadas fueron inoculadas en 400 mL de LB líquido con antibiótico correspondiente más kanamicina, la incubación fue a 37 °C durante toda la noche con agitación de 140 rpm. A partir del cultivo crecido e infectado, se procedió a la purificación por precipitación con PEG, para ello primeramente fue centrifugado a 8000 g utilizando la centrífuga de alta velocidad Thermo Scientific Sorvall LYNX 4000 (Thermo Scientific, USA), el sobrenadante fue incubado a 4 °C con 4 % de PEG 8000 y 3 % de NaCl durante toda la noche, a continuación, el medio que contiene los fagos fue centrifugado a 15000 g, a una temperatura de 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido con buffer TBS. Los fagos resuspendidos fueron purificados utilizando filtro de 0.45  $\mu$  y almacenados a -20 °C en 50 % de glicerol.

### **3.5 Cuantificación de fagos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

Los fagos producidos fueron cuantificados a través de un método de qPCR desarrollado en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, y que fue publicado recientemente (Méndez-Scolari et al., 2019). Brevemente, se utilizaron los *primers* OriM13 Fw-TTCCCTTCCTTTCTCGCCAC y M13Ori Rv2 AGAACGTGGACTCCAACGTC, que van dirigidos específicamente contra el origen de replicación del fago M13. Se utilizó una mezcla de reacción con un volumen final de 10  $\mu$ L, conteniendo: 5  $\mu$ L Mix Universal SYBR Green Supermix (BIORAD, USA), 0,5  $\mu$ L de cada *primer* 10 mM y 2  $\mu$ L de cada templado. Posteriormente fueron amplificados en el termociclador en tiempo real LightCycler® Nano (Roche, Suiza)

utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, 30 ciclos de amplificación de dos etapas: 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s. Por último, se realizó una curva de desnaturalización de los productos, iniciando a 60 °C por 20 s, para luego ir incrementando a 0,1 °C/s hasta 95 °C, para luego finalizar a 95 °C por 20 s.

### **3.6 Obtención de antígeno vacuna**

Para la obtención de antígenos virales del FMDV utilizados en los distintos ensayos, se procedió a realizar una extracción proteica a partir de una vacuna comercial trivalente formulada con FMDV inactivado de tipos O1 Campos, A24 Cruzeiro y C3 Indaial. Para ello se utilizó el método metanol-cloroformo, similar a como se ha descrito anteriormente (Slavov, 2015). Esta proteína fue denominada como antígeno de vacuna (AgV), la misma fue cuantificada por el método BCA utilizando un kit comercial (Bicinchoninic Acid Protein Assay, G-Biosciences, USA).

### **3.7 Análisis de expresión del antígeno GHL por *dot blot***

La presencia del epítipo GHL en los fagos M13-GHL fue comprobada utilizando la técnica *dot blot* (Bastien et al., 1997b). Para ello, en una membrana de nitrocelulosa fueron sembradas siguientes muestras: el fago recombinante M13-GHL, el fago silvestre M13KO7, TBS-glicerol como control negativo y proteínas extraídas de vacuna comercial (AgV) como control positivo. Seguidamente, la membrana fue bloqueada con TBS-leche descremada 2.5 %-Tween 20 0.05 % durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal mAb99 específico contra el epítipo GHL (Pfaff, 1988), en una dilución 1/100 con TBS-leche 2.5%-Tween 0.05 %. Posterior a tres lavados de cinco minutos cada uno con TBS-Tween 20 0,05 %, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG total de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Thermo Scientific, 31430 USA), en una dilución 1/2500, para luego ser revelado utilizando el sustrato luminol (ECL Western Blot Substrate, Promega, USA), a través de un fotodocumentador con detector de luminiscencia (C-DiGit ® Blot Scanner, LI-COR Biosciences, USA).

### 3.8 Análisis de expresión del antígeno GHL por ELISA

La expresión del antígeno GHL en la superficie del fago recombinante se evaluó además por medio de un ensayo de ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con los fagos M13-GHL y M13KO7. Como primer paso, cada fago fue diluido en solución carbonato/bicarbonato pH 9,6 hasta una concentración de  $1 \times 10^{11}$  fagos/100  $\mu$ L e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente con un volumen de 100  $\mu$ L por pocillo. Posteriormente se bloqueó con TBS-BSA 1% durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal mAb99 durante 2 horas a 37 °C, en una dilución de 1/50 con TBS-BSA 1%. Se utilizó el anticuerpo anti-Ratón marcado con HRP (Thermo Scientific, 31430, USA) en una dilución 1/2500, el cual fue incubado durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de cada incubación con los respectivos anticuerpos, los pocillos fueron lavados tres veces durante cinco minutos cada uno con TBS-Tween 20 0,05 %. Para el revelado, se incubó 20 minutos con el sustrato ABTS (ABTS® BioChemica, AppliChem, USA) y se midió la DO a una longitud de onda de 405 nm y 492 nm como referencia, utilizando un lector de placas de 96 pocillos (Thermo Scientific Multiskan GO, USA). Los valores de DO a 405 y 492 nm fueron restados y promediados para luego ser graficados.

### 3.9 Inmunización de ratones

Para el ensayo de inmunización, se utilizaron ratones Suizos Albinos hembras de 8 semanas de edad albergados en el departamento de Farmacología de la FCQ-UNA. Los ratones fueron mantenidos bajo estándares establecidos y aprobados por el Comité de ética de la FCQ-UNA. A excepción de la vacuna comercial anti-aftosa, tanto los fagos como el vehículo de suspensión de los mismos (buffers TBS-Glicerol), fueron inoculados vía intraperitoneal de acuerdo con distintos trabajos de inmunización con fagos publicados anteriormente (Bahadir & Balcioglu, 2011; Bastien et al., 1997a; Deng et al., 2015a). En cuanto a la vacuna comercial (VaC), la misma fue formulada para su aplicación vía intra-muscular. De esa manera, cuatro grupos de 5 ratones fueron inoculados de la siguiente manera: i) con TBS-glicerol 50% vía intra-peritoneal (IP); ii) con el fago M13KO7 suspendido en TBS-Glicerol 50 %, vía IP; iii) con el

fago M13-GHL suspendido en TBS-glicerol 50 %, vía IP; iv) con una vacuna comercial vía intra-muscular (IM). Los diferentes grupos recibieron 2 dosis de refuerzo, la primera a las 2 semanas post inoculación (spi) y la segunda a las 4 spi. Las muestras de sangre fueron colectadas antes de la primera inoculación (pre inmune), y luego a las 2, 4 y 6 spi, antes de cada refuerzo, respectivamente. A las 6 spi se realizó el sangrado final, para ello primeramente cada ratón fue anestesiado utilizando Ketamina (75 mg/Kg) y Xilaxina (5 mg/Kg) por vía IP. Una vez anestesiado completamente, la extracción de sangre se realizó por punción intracardiaca, posteriormente fue realizada la correspondiente eutanasia de los mismos. Los sueros de cada ratón fueron obtenidos por centrifugación de la sangre entera, para luego ser almacenados a -20 °C hasta su correspondiente uso. Para la determinación de la proliferación de esplenocitos, los ratones recibieron un solo refuerzo a las 2 spi, y a las 3 spi los bazos fueron asilados por disección para los ensayos de proliferación celular, previa eutanasia de los mismos.

### **3.10 Evaluación de la respuesta inmune humoral**

Para la evaluación de la respuesta inmune humoral, se utilizaron dos tipos de ELISA indirecto: una en la que los pocillos fueron sensibilizados con los fagos M13KO7; y otra en la que los pocillos fueron sensibilizados con AgV.

El ELISA indirecto sensibilizado con fagos fue utilizado para la detección de anticuerpos anti-Fagos en el suero de los ratones inmunizados tanto con M13KO7 como con M13-GHL. Se procedió de la misma manera como fue descrito en el apartado 3.7, con la única diferencia de que en lugar del anticuerpo monoclonal mAb99, las placas sensibilizadas fueron incubadas con las muestras de sueros obtenidas en los diferentes ensayos de inmunización.

Para la detección de anticuerpos específicos anti-FMDV en sueros de ratones inmunizados con el fago recombinante, se utilizó el ELISA indirecto dirigido contra antígenos de FMDV. Para la sensibilización de las placas, 5 µg de AgV diluidas en buffer carbonato/bicarbonato pH 9,6 fueron colocadas en cada pocillo en un volumen de 100 µL, la incubación fue de 2 horas a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4 °C. Posterior a la sensibilización, se procedió al bloqueo de los pocillos con TBS-

BSA 1 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Los sueros de los ratones fueron diluidos 1/100 con TBS-BSA 1 % en un volumen de 100  $\mu$ L por pocillo, para luego ser incubados durante 2 horas a 37 °C. Por último, se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG total de ratón marcado con HRP (Thermo Scientific, 31430, USA), la incubación fue de 1,5 h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados después de la incubación con los sueros y con el anticuerpo secundario, como ya fue descrito anteriormente. Los pocillos fueron revelados con el sustrato ABTS como ya se mencionó anteriormente. De la misma manera se procedió para evaluar la producción de los isotipos IgG1 e IgG2a, en este caso, utilizando anticuerpos secundarios anti-IgG1 de ratón marcado con HRP (Invitrogen, A10551, USA) y anti-IgG2a de ratón marcado con HRP (Invitrogen, M32207, USA) respectivamente diluidos 1/1000 en TBS-BSA 1%.

### 3.11 Análisis de la respuesta celular

Una semana luego de la última inoculación, se procedió a la eutanasia de los ratones inmunizados, y de manera inmediata el bazo fue aislado en condiciones asépticas, para luego colocar el órgano en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). A continuación los esplenocitos fueron extraídos del bazo como se indica en Kruisbeek et al. (2000). Una vez separadas las células, fueron contadas en cámara de Neubauer con azul de tripán. Para evaluar la proliferación celular, 100  $\mu$ L por pocillo de  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células/mL fueron cultivadas durante 72 horas en medio DMEM completo a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, utilizando los siguientes inductores: AgV estéril, M13KO7, concanavalina A (ConA), fitohemaglutinina (PHA), lipopolisacárido (LPS). Como control negativo se utilizaron células sin estimular. Transcurridas 48 horas de inducción, se colocó resazurina, y a las 72 horas, la absorbancia fue medida a las longitudes de onda de 570 y 600 nm. Con los valores obtenidos se calculó el índice de diferencia de reducción entre células inducidas y no inducidas, el cual es un indicativo de la tasa de proliferación celular, utilizando la siguiente ecuación:

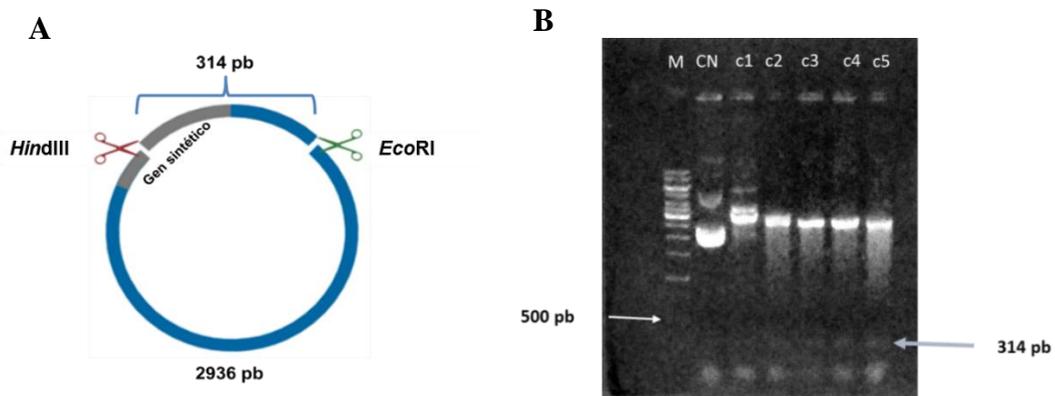
$$IR = \frac{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2 A} \lambda 1 - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1 A} \lambda 2 \text{ de células inducidas}}{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2 A^\circ} \lambda 1 - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1 A^\circ} \lambda 2 \text{ de células sin inducir}}$$

Donde  $\epsilon_{ox}$  es el coeficiente de extinción molar de la forma oxidada de la resazurina,  $A$  es la absorbancia de los pocillos que contiene las células que fueron tratadas con el mitógeno,  $A^{\circ}$  es la absorbancia de los pocillos que contienen las células sin inducir,  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son las longitudes de ondas correspondientes a 570 y 600 nm respectivamente (Thermo Fisher Scientific).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Obtención de bacterias ER2738 transformadas

El plásmido pGHL fue transformado en bacterias ER2738 y de las bacterias transformadas fueron seleccionadas 5 colonias resistentes a ampicilina que incorporaron dicho plásmido. Para cada uno de estos clones se procedió a extraer el ADN plasmídico y se analizó a través de cortes con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI para confirmar la presencia del gen sintético (**Fig 8.A**). Como se muestra en la **Figura 8.B**, todos los clones presentaron la banda correspondiente al fragmento de 314 pb, indicativo de la presencia del gen sintético.

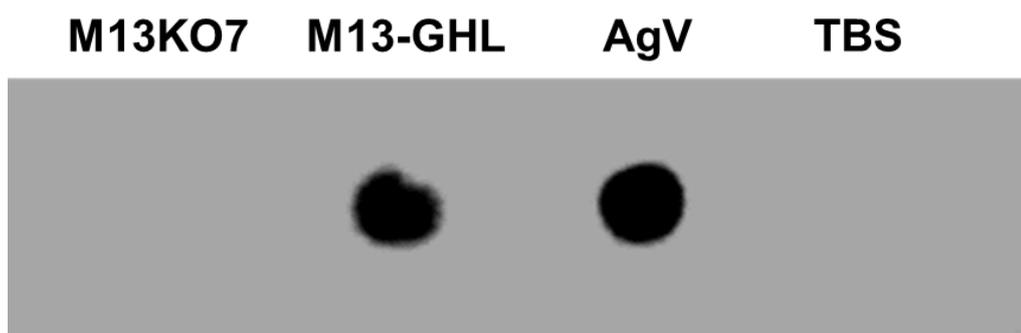


**Figura 8. Presencia del gen sintético en los clones transformados.** Productos de digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI de los plásmidos obtenidos a partir de clones transformados. **A)** Esquema del corte y de los fragmentos generados. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión. M: marcador de peso molecular; CN: plásmido sin digerir; c1, c2, c3, c4, c5: clones del 1 al 5.

## 4.2 Fago recombinante M13-GHL

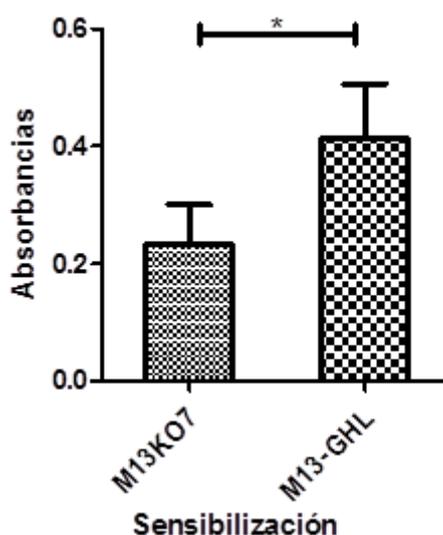
De los 4 clones de bacterias ER2738 transformadas que tuvieron un perfil de restricción esperado (c2, c3, c4 y c5), el clon 4 fue utilizado para la propagación y purificación de los fagos recombinantes M13-GHL. Se obtuvo bacteriófagos en concentraciones del orden de  $1 \times 10^{13}$  VGC/mL (copias de genoma viral, por sus siglas en inglés), tanto para M13KO7 como para M13-GHL. Estas concentraciones pudieron ser determinadas a través de un método de cuantificación de fagos filamentosos basado en qPCR direccionada contra el origen de replicación viral de los fagos filamentosos, previamente desarrollado en el laboratorio (Méndez-Scolari et al., 2019).

Culminada la producción y cuantificación de los fagos, se procedió a verificar la correcta expresión del antígeno GHL en la superficie del fago recombinante M13-GHL. Para ello, se realizó un ensayo de *dot blot* utilizando el anticuerpo monoclonal mAb99, dirigido contra el epítipo GHL. En la **Figura 9** se puede observar la señal producida por el fago M13-GHL y el control positivo correspondiente al AgV. No se observó señal en el fago M13KO7 (sin epítipo) ni en el vehículo TBS. Estos resultados muestran la expresión del epítipo GHL en la superficie de los fagos recombinantes.



**Figura 9. Presencia del antígeno GHL en la superficie de M13-GHL.** Detección del péptido GHL en los fagos M13-GHL, utilizando el anticuerpo monoclonal mAb99 en una técnica de *dot blot*. M13KO7: fago silvestre; M13-GHL: fago recombinante; AgV: antígeno de vacuna comercial; TBS: medio de resuspensión de los fagos.

De manera a confirmar la expresión del antígeno GHL en la superficie del fago M13-GHL, se procedió al diseño de un ensayo de ELISA, donde los pocillos fueron sensibilizados con el fago silvestre M13KO7 o el fago recombinante M13-GHL. Nuevamente la presencia del epítipo fue determinada usando el anticuerpo monoclonal mAb99 como anticuerpo primario. En la **Figura 10** se representan los valores de absorbancias obtenidos tanto para los pocillos sensibilizados con M13KO7 como para los pocillos sensibilizados con M13-GHL. El promedio de absorbancias fue de 0,415 para el fago recombinante M13-GHL y 0,236 para el fago silvestre M13KO7, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,0254$ ). Esto indica que el péptido GHL fue correctamente expresado en la superficie del fago recombinante M13-GHL.



**Figura 10. ELISA con fagos recombinantes.** Los pocillos fueron sensibilizados por triplicado con M13KO7 y M13-GHL. Como anticuerpo primario se utilizó mAb99. Los valores corresponden al promedio de las absorbancias obtenidas entre las réplicas, y las barras de error a los desvíos estándar de los mismos. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, \*  $p < 0,05$ .

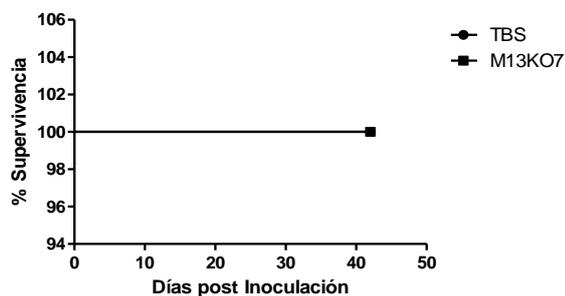
### 4.3 Inmunización de ratones

Con el propósito de obtener resultados preliminares a cerca de la inmunogenicidad de del fago M13KO7, se realizó un ensayo de inmunización con dos grupos de tres ratones hembra de 8 semanas de edad. Un grupo fue inoculado con 250  $\mu\text{L}$  de TBS-Glicerol 50 % (grupo TBS) y el otro grupo fue inoculado con  $1 \times 10^{12}$  fagos M13KO7

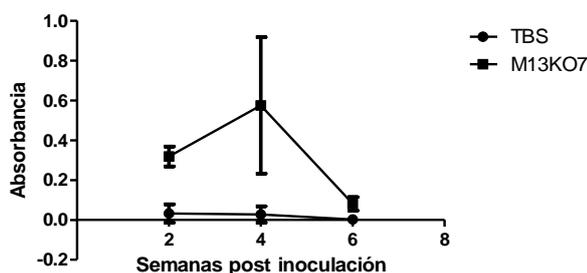
en un volumen de 250  $\mu$ L de TBS-Glicerol 50 % (grupo M13KO7). Muestras de sangre fueron extraídas antes de la inoculación y luego cada dos semanas, durante seis spi. En la **Figura 11.A** se muestra el gráfico de supervivencia de los animales inoculados, donde se observa que el 100 % de los ratones sobrevivió sin inconvenientes durante el tiempo del ensayo.

Para analizar la respuesta de anticuerpos anti-Fago, se realizó un ensayo de ELISA en el que los pocillos fueron sensibilizados con M13KO7. En la **Figura 11.B** se muestran las absorbancias obtenidas en las distintas spi. Se puede observar claramente un aumento de la señal hasta las 4 spi, lo que representa un aumento de los anticuerpos anti-M13KO7 en las muestras colectadas, sin embargo, a las 6 spi se produjo una disminución de la señal indicando la necesidad de realizar refuerzos en los siguientes ensayos de inmunización.

**A**

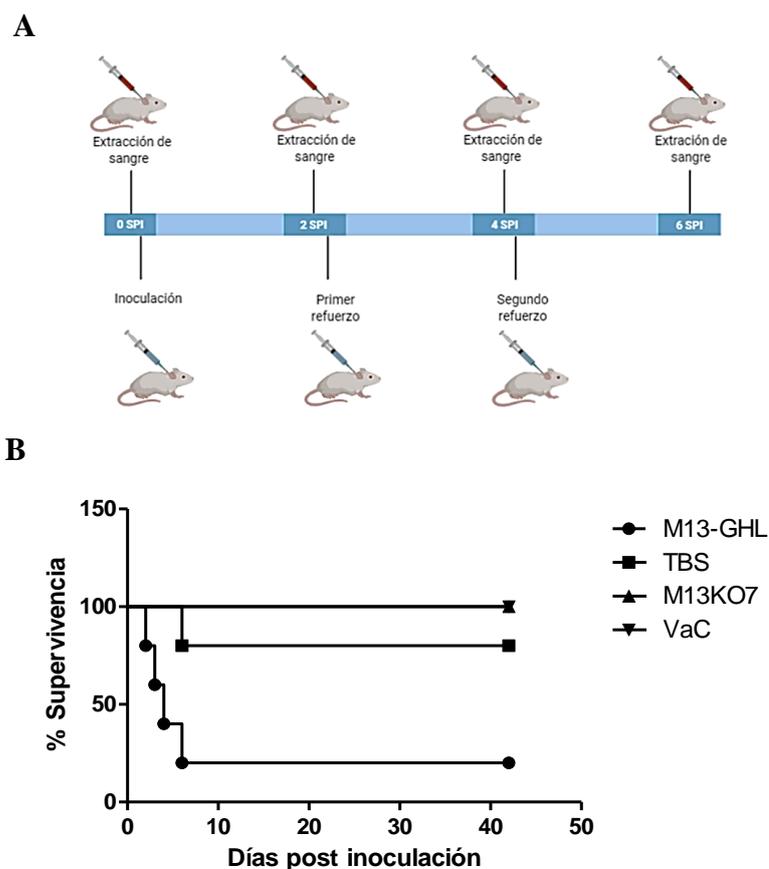


**B**



**Figura 11. Respuesta humoral a M13KO7.** Dos grupos de tres ratones fueron inoculados con TBS-Glicerol 50% y  $1 \times 10^{12}$  fagos M13KO7 respectivamente, muestras de suero fueron obtenidas a intervalos de 2 semanas hasta las 6 spi. **A.** Gráfico de supervivencia de los ratones inoculados. **B.** Ensayo de ELISA utilizando suero de ratones inmunizados. Los valores de absorbancia corresponden al promedio entre las 3 réplicas biológicas en cada grupo. Las barras de error representan el desvío estándar. TBS: grupo inoculado con TBS-Glicerol 50 %; M13KO7: grupo inoculado con M13KO7.

En base a esta información, en el siguiente ensayo de inoculación se realizó refuerzos de la vacuna, para ello 4 grupos de 5 ratones hembra fueron inoculados tres veces cada dos semanas como se indica en la **Figura 12.A**. El primer grupo fue inoculado vía IP con de TBS-Glicerol 50 % (grupo TBS); el segundo grupo fue inoculado vía IP con  $5 \times 10^{12}$  fagos M13KO7 resuspendidos en TBS-Glicerol 50 % (M13KO7); un tercer grupo fue inoculado vía IP con  $5 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL en de TBS-Glicerol 50% (grupo M13-GHL); y el último grupo fue inoculado vía IM con 20  $\mu$ L de una vacuna comercial antiaftosa (grupo VaC), conforme a la dosis estipulada por peso según lo manifestado por el proveedor. Las muestras de sangre fueron obtenidas cada dos semanas hasta la sexta spi (**Figura 12.A**). En este ensayo, se presentó 20 % de supervivencia en los ratones inoculados con el fago recombinante M13-GHL, la supervivencia para los grupos M13KO7 y VaC fue del 100% y en el grupo TBS, uno de los 5 ratones murió a los seis días post inoculación (**Figura 12.B**). Los ratones del grupo M13-GHL, además de falta de apetito, mostraron signos de dolor en las horas posteriores a la inoculación, la muerte de los cuatro ratones se produjo a los 2, 3, 4 y 6 días después de la primera inoculación. Además, los ratones muertos fueron examinados, encontrándose signos de inflamación intestinal y obstrucción gástrica de alimentos ingeridos (**Figura 12.B**).

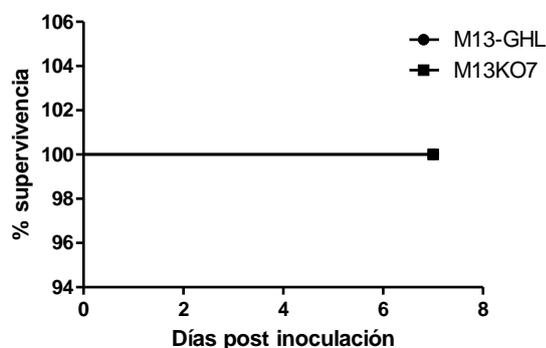


**Figura 12. Inmunización de ratones con M13-GHL.** Cuatro grupos de 5 ratones cada uno fueron inmunizados respectivamente con TBS-Glicerol 50 % vía IP (TBS),  $5 \times 10^{12}$  fagos M13KO7 vía IP (M13KO7),  $5 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL vía IP (M13-GHL) y vacuna comercial (VaC) vía IM. **A.** Línea de tiempo que representa el esquema de inoculación y extracción de muestras planificado. **B.** Gráfico que representa el porcentaje de supervivencia de los animales inoculados en este ensayo.

Debido a los efectos adversos producidos en los ratones inoculados con  $5 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL, se procedió a realizar un ensayo de inoculación utilizando una cantidad de  $1 \times 10^{12}$  fagos, de manera a poder evaluar la supervivencia de los ratones. Así, dos grupos de 3 ratones hembra de 8 semanas de edad fueron inoculados vía IP con  $1 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL y M13KO7 respectivamente. Estos ratones fueron observados diariamente durante una semana, en búsqueda de algún signo de dolor o estrés. Utilizando estas condiciones de inoculación, la supervivencia de los ratones fue del 100 % (**Figura 13**), además no se observaron signos de dolor o estrés en los animales.

A partir de estos resultados se tomó la decisión de utilizar una cantidad de  $1 \times 10^{12}$  fagos, tanto para M13KO7 como M13-GHL, en los siguientes experimentos de

inmunización, realizando dos refuerzos cada 2 semanas con la misma cantidad de fagos.



**Figura 13. Gráfico de supervivencia de ratones inoculados con fagos.** Dos grupos de 3 ratones fueron inoculados con  $1 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL y M13KO7, respectivamente. La supervivencia de estos fue evaluada durante una semana luego de la inoculación.

#### 4.4 Respuesta inmune humoral

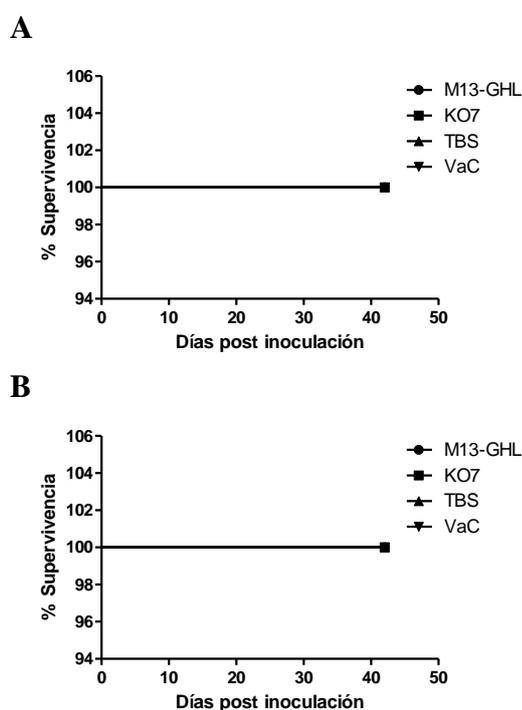
Para la evaluación de la respuesta inmune humoral, 4 grupos de 5 ratones fueron inoculados, según el esquema representado en la **Figura 12.A**. Se realizaron extracciones periódicas de sangre cada dos semanas antes de cada refuerzo y finalmente a la 6ta spi. Los ratones fueron inoculados en una cantidad de  $1 \times 10^{12}$  fagos por ratón en un volumen final de 100  $\mu$ L, el grupo TBS fue inoculado con 100  $\mu$ L de TBS-Glicerol 50%, todos vía IP, por último, el grupo VaC fue inmunizado con 20  $\mu$ L de vacuna comercial vía IM.

Todos los ratones inoculados bajo estas condiciones sobrevivieron de manera óptima durante los 42 días de experimentación, como se puede ver en el gráfico de supervivencia en la **Figura 14.A**.

Utilizando los sueros obtenidos de estos ratones inmunizados, primeramente, se procedió a evaluar la presencia de anticuerpos anti-Fago, para confirmar la obtención de una respuesta inmune través de un ensayo ELISA con los pocillos sensibilizados con el fago M13KO7. En la **Figura 14.B** se observa un aumento de la absorbancia hasta la sexta spi, tanto para el grupo M13KO7 (con un DO máximo de 1,83) como

para el grupo M13-GHL (DO máximo de 1,81). Sin embargo, este aumento se hace menos evidente a partir de la cuarta spi. Es importante destacar que las absorbancias de los grupos TBS y VaC se mantuvieron bajas, sugiriendo la ausencia de anticuerpos anti-Fago.

Estos resultados muestran la presencia de anticuerpos anti-Fago en los sueros de los animales inoculados tanto con el M13-GHL como con M13KO7, demostrando activación del sistema inmune contra el fago.



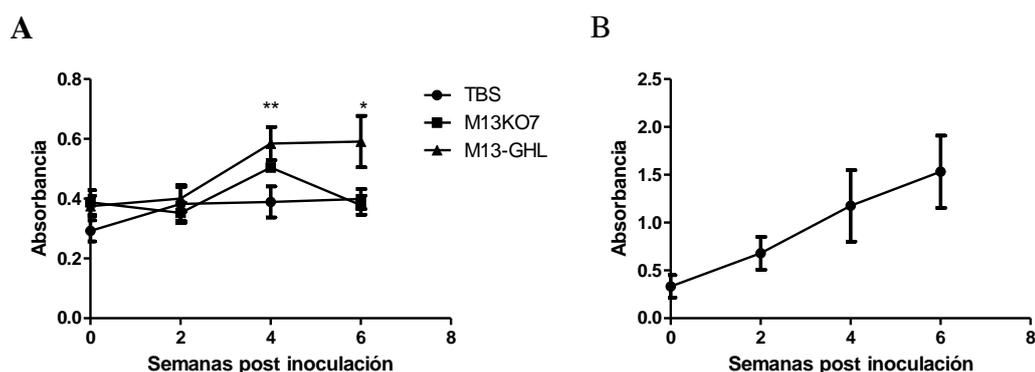
**Figura 14. Respuesta de anticuerpos anti-Fago en ratones inmunizados.** Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-Fago M13KO7 en suero de ratones inmunizados. **A.** Gráfico de supervivencia de ratones inmunizados. **B.** ELISA sensibilizado con M13KO7, utilizando suero de ratones inmunizados con TBS-Glicerol (TBS), M13KO7, M13-GHL y vacuna comercial (VaC). Los valores mostrados corresponden al promedio de las absorbancias obtenidas para cada ratón en un mismo grupo, en los diferentes tiempos post inoculación. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas biológicas.

Para evaluar la producción de anticuerpos totales IgG anti-FMDV se utilizó un método de ELISA en donde los pocillos fueron sensibilizados con el AgV. En la **Figura 15. A.** se grafican los resultados obtenidos en este ensayo; para el grupo perteneciente a

los animales inoculados con M13-GHL, se puede notar un aumento significativo de la absorbancia con respecto a los demás grupos.

Las absorbancias para el grupo TBS se mantuvieron bajas con pequeñas variaciones en el tiempo (**Figura 15. A**). Los ratones inoculados con la vacuna comercial, mostraron altos niveles de anticuerpos reflejados en sus valores de absorbancia que aumentaron progresivamente hasta la sexta spi (**Figura 15. B**).

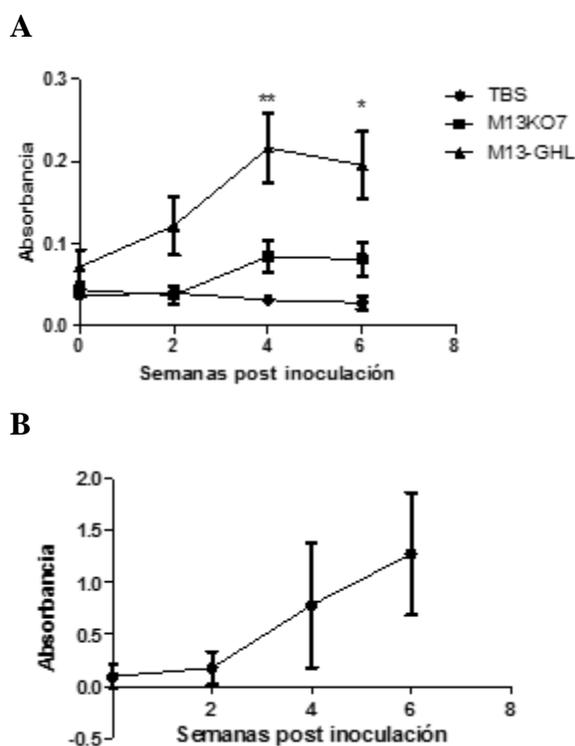
Se puede observar una respuesta específica de anticuerpos anti-FMDV significativamente mayor en el grupo inoculado con M13-GHL, confirmando que el epítipo GHL expuesto en su superficie puede ser reconocido como un inmunógeno por el sistema inmune.



**Figura 15. Anticuerpos anti-FMDV en suero de ratones inmunizados.** Detección de anticuerpos IgG total anti-FMDV a través de un ensayo de ELISA sensibilizado con AgV. **A.** Respuesta obtenida en sueros de ratones inmunizados TBS-glicerol (TBS), M13KO7 y M13-GHL. **B.** Respuesta obtenida en suero de ratones inmunizados con vacuna comercial. Los valores mostrados corresponden al promedio de las absorbancias obtenidas para cada ratón de un mismo grupo, en los diferentes tiempos post inoculación. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas biológicas. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

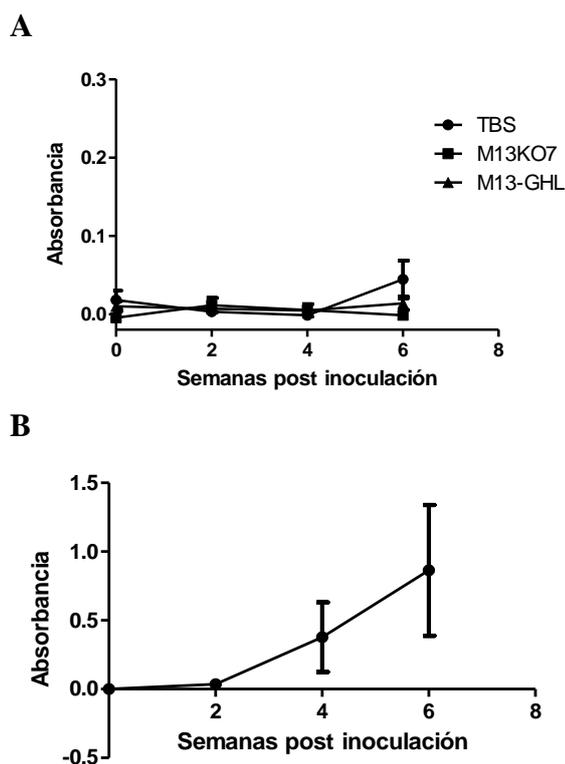
A fin de determinar los isotipos de IgG anti-FMDV, se utilizó un ensayo de ELISA similar al descrito para la evaluación de IgG total, utilizando anticuerpos secundarios específicos anti-IgG1 y anti-IgG2a conjugados con HRP. Para los anticuerpos de tipo IgG1, la respuesta aumentó progresivamente hasta la 4 spi, obteniéndose valores de absorbancia significativamente mayores en el grupo M13-GHL en comparación con el grupo M13KO7, tanto a las 4 spi como a las 6 spi (**Figura 16.A**). Para el grupo TBS,

los valores de absorbancia se mantuvieron bajos durante las 6 spi (**Figura 16.A**). El grupo de ratones inoculados con la vacuna comercial mostró un aumento progresivo en los valores de absorbancia durante las 6 spi (**Figura 16.B**).



**Figura 16. Respuesta de anticuerpos de isotipo IgG1.** Detección de anticuerpos IgG1 anti-FMDV a través de un ensayo de ELISA sensibilizado con AgV. **A.** Respuesta obtenida en sueros de ratones inmunizados con TBS-Glicerol (TBS), M13KO7 y M13-GHL. **B.** Respuesta obtenida en sueros de ratones inmunizados con vacuna comercial. Los valores mostrados corresponden al promedio de las absorbancias obtenidas para cada ratón de un mismo grupo, en los diferentes tiempos post inoculación. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas biológicas. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

A diferencia de lo observado para el isotipo IgG1, los valores de absorbancia obtenidos en el ELISA IgG2a anti-FMDV se mantuvieron muy bajos durante las 6 spi, tanto para el grupo M13-GHL como para el grupo M13KO7 y TBS, lo cual se traduce en una falta respuesta del tipo IgG2a (**Figura 17.A**). La respuesta obtenida para los ratones inoculados con la vacuna comercial tuvo un aumento progresivo en el tiempo, lo cual se refleja en el aumento de la absorbancia hasta la sexta spi (**Figura 17.B**).



**Figura 17. Respuesta de anticuerpos de isotipo IgG2a.** Detección de anticuerpos IgG2a anti-FMDV a través de un ELISA sensibilizado con AgV. **A.** Respuesta obtenida en sueros de ratones inmunizados con TBS-Glicerol (TBS), M13KO7 y M13-GHL. **B.** Respuesta obtenida en sueros de ratones inmunizados con vacuna comercial. Los valores mostrados corresponden al promedio las absorbancias obtenidas para cada ratón de un mismo grupo, en los diferentes tiempos post inoculación. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas biológicas.

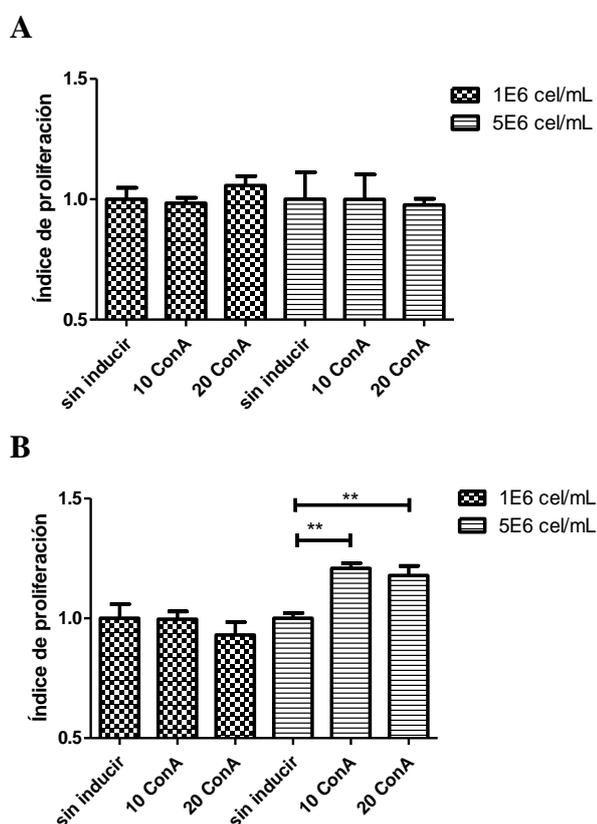
#### 4.5 Respuesta inmune celular

Los ensayos de proliferación de esplenocitos constituyen una manera de evaluar la respuesta inmune celular que pudiera generarse posterior a una inmunización de ratones. De esta manera, como paso inicial, se procedió a realizar ensayos que permitieron establecer el método de proliferación.

En un primer ensayo, se utilizaron dos concentraciones distintas de células por pocillo ( $1 \times 10^6$  cél/mL y  $5 \times 10^6$  cél/mL) aisladas a partir del bazo de un ratón. Las células fueron estimuladas con dos concentraciones del mitógeno ConA ( $10 \mu\text{g/mL}$  y  $20 \mu\text{g/mL}$ ), además de las células sin inducir utilizadas como control negativo. Otro parámetro evaluado en este ensayo fue el tiempo de incubación con el reactivo

resazurina, por lo que el mismo fue agregado a los esplenocitos a las 48 y 64 horas post inducción. La lectura de absorbancia se realizó a las 72 horas.

En la **Figura 18** se representan los resultados obtenidos en este ensayo. Las células incubadas durante 8 horas con resazurina, no mostraron una diferencia significativa entre las células estimuladas con el mitógeno y las no estimuladas (tanto en las concentraciones de  $1 \times 10^6$  cél/mL y  $5 \times 10^6$  cél/mL) (**Figura 18.A**). En cambio, las células incubadas durante 24 horas con el colorante resazurina, mostraron una diferencia significativa cuando fueron inducidas con ConA en comparación con las que no fueron inducidas, a una densidad celular fue de  $5 \times 10^6$  cél/mL (**Figura 18.B**).

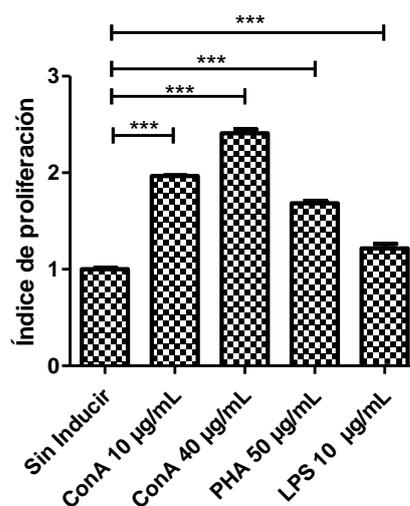


**Figura 18. Proliferación de esplenocitos inducidos con ConA.** Células extraídas del bazo de un ratón hembra suizo albino fueron evaluadas bajo estímulo de 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de ConA, y en concentraciones de  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  cél/mL. **A.** Células que fueron incubadas durante 8 h con resazurina. **B.** Células que fueron incubadas durante 24 h con resazurina. Los valores mostrados corresponden al índice de proliferación, promediados entre las réplicas analíticas. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, \*\*  $p < 0,01$ .

Considerando estos resultados, se decidió utilizar  $1 \times 10^7$  cél/mL por pocillo en los siguientes ensayos. Posteriormente se evaluaron distintos mitógenos a diferentes concentraciones (10  $\mu\text{g/mL}$  ConA, 40  $\mu\text{g/mL}$  ConA, 50  $\mu\text{g/mL}$  de PHA y 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS). Las células fueron incubadas durante 72 horas en las condiciones ya mencionadas, y para el revelado, el reactivo resazurina fue agregado a las 48 horas post inducción.

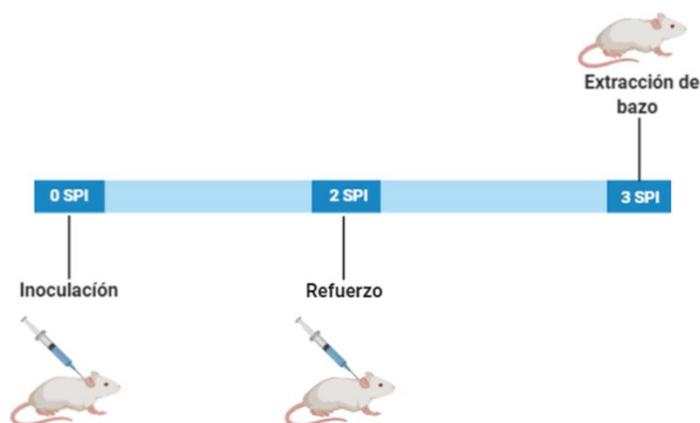
Las células estimuladas con los diferentes mitógenos mostraron señales significativamente mayores cuando se compararon con las células no inducidas (**Figura 19**). Las que fueron tratadas con 40  $\mu\text{g/mL}$  de ConA tuvieron un mayor índice de proliferación (con un valor medio de 2,40) en comparación con las células sin inducir; por otro lado, las células que fueron estimuladas con 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS fueron las que tuvieron menor índice de proliferación (con un valor medio 1.22) entre los distintos inductores utilizados.

Estos experimentos permitieron establecer las condiciones óptimas del ensayo de proliferación de esplenocitos que serán utilizados en los experimentos de inoculación de ratones.



**Figura 19. Proliferación de esplenocitos bajo distintos estímulos de mitógenos.** Células aisladas del bazo de un ratón hembra suizo albino fueron estimuladas con los siguientes mitógenos: 10 µg/mL ConA, 40 µg/mL ConA, 50 µg/mL de PHA y 10 µg/mL de LPS; utilizando una concentración de  $1 \times 10^7$  cél/mL. Los valores mostrados corresponden al índice de proliferación, promediados a partir de las réplicas analíticas. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas. Prueba t de Student de una cola, con un 95% de confianza, \*\*\*  $p < 0,001$ .

Teniendo establecidas las condiciones óptimas para el ensayo de proliferación de esplenocitos, se procedió a realizar la inoculación para la evaluación de la respuesta inmune celular generada por el fago recombinante M13-GHL. Con este fin, cuatro grupos de ratones hembra de 8 semanas de edad fueron inoculados como sigue: el primer grupo con 100 µL de TBS-glicerol 50% vía IP; el segundo fue inoculado con  $1 \times 10^{12}$  fagos M13KO7 en 100 µL de TBS-glicerol 50%; el tercer grupo con  $1 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL en 100 µL de TBS-glicerol 50%; y el último grupo con 20 microlitros de vacuna comercial vía IM. Dos semanas después de la primera inoculación se realizó un refuerzo con las mismas cantidades ya especificadas, y finalmente el bazo fue extraído en el tercera spi, según se indica en el esquema de la **Figura 20**.



**Figura 20. Esquema de inoculación para ensayo de proliferación de esplenocitos.**

El 100% de los animales utilizados en este ensayo sobrevivieron sin dificultad hasta el final del experimento. Las células fueron aisladas de cada bazo y evaluadas utilizando el ensayo de proliferación de esplenocitos. Como estímulo específico de proliferación se utilizaron dos concentraciones de AgV (6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que permitió evaluar la respuesta celular contra el FMDV. Como control positivo se utilizó 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ConA. Las células también fueron estimuladas con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de M13KO7, buscando comprobar la capacidad de los fagos filamentosos para generar una respuesta inmune celular.

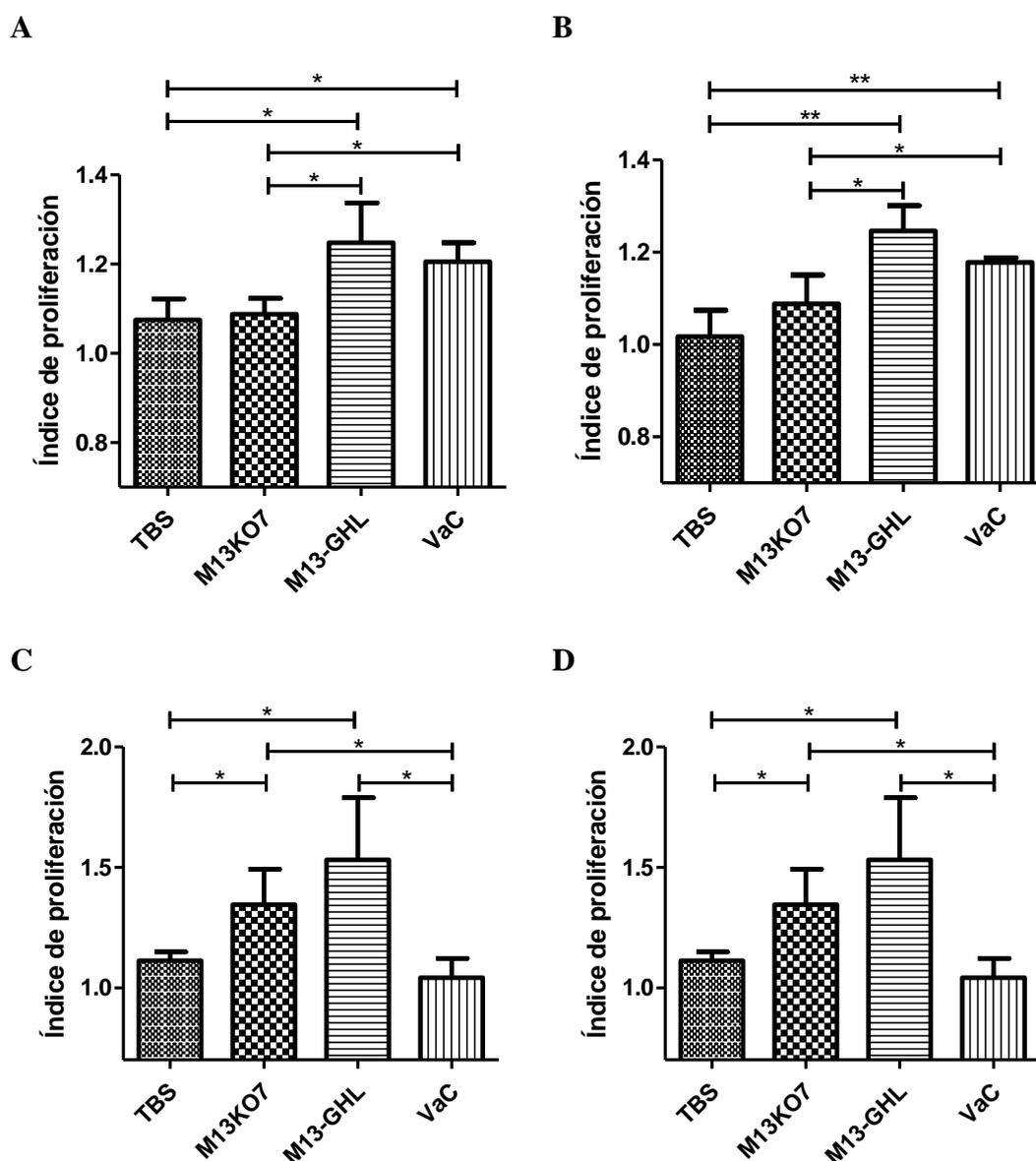
La estimulación con AgV en una concentración de 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , produjo un aumento significativo en la proliferación de las células provenientes de ratones inmunizados con el fago M13-GHL y con la vacuna comercial, en comparación tanto con el grupo control TBS y el grupo inmunizado con M13KO7 (**Figura 21**). Aunque el valor promedio de índice proliferación fue levemente mayor en el grupo de M13-GHL que en el grupo VaC, no se han encontrado diferencias significativas entre ellos.

Similares resultados fueron observados cuando las células fueron estimuladas con 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgV (**Figura 21.B**), sin embargo, la diferencia significativa fue mayor en el grupo M13-GHL y VaC cuando se las compara con el grupo control TBS. Además, cuando fueron comparados con el grupo M13KO7, también se obtuvo una proliferación significativa (**Figura 21.B**). Al, igual que la inducción con 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

de AgV, tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo M13-GHL y el grupo inmunizado con vacuna comercial (**Figura 21.B**). Estos hallazgos son indicativos de que el M13-GHL posee la capacidad de generar una respuesta celular dirigida contra el FMDV, similar a la respuesta generada por la vacuna comercial en las condiciones de inoculación utilizadas en este trabajo.

Al inducir con el M13KO7 se observó un aumento significativo en la proliferación de los esplenocitos provenientes de los ratones inmunizados con M13-GHL y M13KO7 (**Figura 21.C**), en comparación al grupo TBS y VaC. Estos resultados sugieren que los fagos filamentosos son capaces de generar una respuesta inmune del tipo celular. La inducción con el mitógeno ConA generó en todos los grupos una proliferación celular con valor similar entre los distintos grupos, confirmando que las células extraídas en todos los grupos se encuentran en condiciones similares de proliferación (**Figura 21.D**).

En conjunto, los resultados demuestran que el fago recombinante M13-GHL fue capaz de generar una respuesta humoral y celular dirigida contra el FMDV. En cuanto a la respuesta humoral, prevalecen los anticuerpos del tipo IgG1, indicativo de una respuesta del tipo Th2.



**Figura 21. Proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados.** Evaluación de la proliferación de esplenocitos obtenidos de bazos de ratones inmunizados con TBS-Glicerol 50% (TBS), M13KO7, M13-GHL y vacuna comercial (VaC). **A.** Esplenocitos estimulados con 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgV **B.** Esplenocitos estimulados con 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgV. **C.** Esplenocitos estimulados con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de M13KO7. **D.** Esplenocitos estimulados con 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ConA. Los valores mostrados corresponden al índice de proliferación determinado por ratón, y luego promediados entre las réplicas biológicas. Las barras de error representan el desvío estándar obtenido entre las réplicas. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 5 DISCUSIÓN

El FMDV es el agente causante de la FMD, e infecta a animales salvajes y domésticos de pezuña hendida, tales como ganado bovino, ovejas, cabras, cerdos y búfalos, animales de importancia para la alimentación humana y la industria ganadera. Tres cuartas parte del ganado mundial susceptible a la FMD está presente en las regiones endémicas de esta enfermedad. Las epidemias desatadas por el FMDV generan gran impacto a nivel mundial, tanto por el movimiento económico que este rubro supone, así como por su importancia para la salud humana (Knight-Jones et al., 2017; OIE, 2019a).

Paraguay, un país cuya economía está basada principalmente en la producción agro-ganadera, ocupó el puesto 11 como exportador de carne a nivel mundial en el 2019, con 320.000 toneladas de carne exportada según un reporte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (Meador & Balbi, 2019), destacando la importancia de este rubro en el país. Debido a que la principal forma de combatir la FMD en el Paraguay es la vacunación periódica, se lo clasifica como una región libre de aftosa con vacunación. Esta clasificación implica una dificultad para la exportación de sus productos ganaderos a los países o zonas libres de aftosa sin vacunación, quienes poseen como principal estrategia el sacrificio de los animales infectados, entre otras acciones (OIE, 2019b, 2019a). Esta dificultad se debe principalmente a que la vacuna utilizada para combatir esta enfermedad puede presentar contaminaciones con proteínas no estructurales, lo cual dificulta diferenciar los animales vacunados de los infectados a través de las pruebas serológicas durante los procedimientos de vigilancia (Doel, 2003; OIE, 2019a). Además, las vacunas utilizadas aún presentan algunos problemas, tales como la necesidad de realizar refuerzos periódicos debido a la corta duración de la inmunogenicidad, la estricta utilización de una cadena de frío para el transporte de las mismas debido a su termolabilidad, entre otras (Doel, 2003).

En este trabajo se propuso abordar estos problemas a través de la producción de bacteriófagos filamentosos recombinantes que expresen en su superficie el péptido antigénico GHL del FMDV acoplado a la proteína principal pVIII. Este péptido antigénico posee secuencias de la región denominada bucle GH de la proteína estructural VP1.

Para la producción de los fagos recombinantes, se utilizó un gen sintético, previamente diseñado en el Departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, el cual fue insertado en un plásmido. Este plásmido, contiene la secuencia codificante de la proteína pVIII recombinante y carece de señal de empaquetamiento, lo que significa que el mismo no podrá empaquetarse en el fago naciente, por lo que los fagos recombinantes poseerán el genoma del fago *helper* M13KO7 utilizado. Esto permite una mayor versatilidad para diseños futuros que busquen mejorar la respuesta inmune, por ejemplo, utilizando genomas virales tipo fagómidos en donde se incorpore un gen que permita la expresión de algún antígeno de FMDV o citoquinas, ya que se ha visto que los fagos filamentosos podrían funcionar como transportadores de vacunas de ADN (Hashemi et al., 2010).

Se ha considerado al péptido GHL de la proteína estructural VP1 del FMDV como el más indicado para la presentación en la superficie del fago, ya que GHL es un antígeno inmunodominante capaz de generar anticuerpos neutralizantes, debido a que posee el motivo RGD, el cual está implicado en la principal forma de entrada del virus a su célula huésped, a través de la unión a integrinas y su posterior endocitosis (Kotecha et al., 2017; Vivian O'Donnell et al., 2008).

La expresión del péptido GHL acoplado a la proteína principal pVIII en la superficie del fago filamentosos, posibilita presentar una gran cantidad del péptido inmunogénico en la superficie del fago, lo cual es favorable cuando el objetivo es generar una respuesta inmune. Se ha visto que para un mismo antígeno, la respuesta de anticuerpos es más potente cuando son expresados en la proteína pVIII en comparación a cuando son presentadas en la proteína pIII (Meola et al., 1995).

La presencia del péptido GHL en la superficie del fago M13-GHL se confirmó a través de la técnica de *dot blot*, la misma se caracteriza principalmente porque permite detectar antígenos conformacionales, ya que la muestra fue sembrada directamente en

la membrana sin ningún tipo de tratamiento desnaturalizante. Como se observa en la **Figura 9**, se obtuvo señal en los puntos donde fueron sembrados el fago M13-GHL y el control positivo AgV, en cambio no se obtuvo señal en el punto que corresponde al fago M13KO7. Este resultado demuestra la presencia del péptido de FMDV en el fago M13-GHL producido. Considerando que el anticuerpo mAb199 utilizado en este ensayo fue obtenido a partir de inmunizaciones con virus inactivado y que además es capaz de unir a la partícula del FMDV (Pfaff, 1988), este resultado también indica que el péptido en el fago M13-GHL presenta una conformación estructural similar a la nativa. Resultados similares se observaron en fagos que expresan un péptido inmunogénico proveniente del VIH-1, éste mostró una conformación similar a la que posee cuando se encuentra unida anticuerpos, esto podría dar indicios de que la expresión de péptidos en la superficie de los fagos permitiría adoptar una conformación similar a la nativa (Jelinek et al., 1997).

Así también la presencia del péptido fue comprobada a través de un ensayo de ELISA indirecto en donde los pocillos fueron sensibilizados con el fago M13-GHL o el fago M13KO7(**Figura 10**). El reconocimiento del epítipo GHL por el anticuerpo mAb99 indica que el péptido se expresa en la superficie del fago y con una conformación similar a la nativa, por lo tanto, se podría generar una respuesta de anticuerpos contra el FMDV.

A fin de evaluar si el fago transportador del péptido GHL induce respuesta inmune se inocularon ratones y posteriormente se evaluó la respuesta inmune humoral y celular. Como ensayo preliminar para evaluar la respuesta inmune generada por los fagos, se utilizaron dos grupos de ratones que fueron inoculados una sola vez con M13KO7 ( $1 \times 10^{12}$  fagos por ratón) o TBS-Glicerol 50% (medio). Durante las seis semanas de duración del ensayo, la supervivencia de los ratones fue del 100%, sin complicaciones, concluyendo que la dosis y el medio de resuspensión no poseen un efecto tóxico por la vía de inoculación utilizada. Estudios anteriores demuestran el uso de glicerol como aditivo en vacunas y otros tipos de tratamientos (Braun et al., 2009; Dalla Vedova et al., 1976; Yabu et al., 1998).

Se detectaron anticuerpos IgG total anti-Fago en el suero de los ratones inoculados, evaluado a través de ensayo de ELISA (Figura 11B). Pudo obtenerse un aumento de la señal de absorbancia hasta la cuarta spi, a partir de la cual ocurrió un descenso de ésta a hasta la sexta spi, indicando que hubo un aumento de anticuerpos anti-M13KO7 que llegó a un pico máximo a las 4 spi y partir de la cual hubo un descenso (**Figura 11.B**). Estos resultados indicaron la necesidad de establecer refuerzos periódicos para los siguientes experimentos inoculación, similar a como se ha hecho en estudios anteriores donde se han utilizado vacunas de fagos (Bahadir & Balcioglu, 2011; Bastien et al., 1997a; Y. Wang et al., 2014a). Por otro lado, los resultados también muestran la capacidad que tienen los fagos filamentosos de generar una respuesta inmune humoral por sí solos (Kneissel et al., 1999; Van Hauten et al., 2006).

Cuando los ratones fueron inoculados con una cantidad de  $5 \times 10^{12}$  fagos M13-GHL, 4 de los 5 ratones no sobrevivieron a la inoculación, observándose signos de dolor, malestar y estrés en los mismos desde la inoculación hasta su deceso (**Figura 12.B**). El único ratón sobreviviente de este grupo también mostró signos de estrés y malestar, además de disminución de peso, estos signos fueron agudos, y luego de una semana desaparecieron. Es importante notar que este fenómeno probablemente fue provocado por la presencia del péptido GHL, ya que no se observaron muertes en los grupos M13-KO7 y VaC. Aunque uno de los ratones del grupo TBS no sobrevivió, fue considerado como un evento aleatorio debido a que los demás ratones del grupo sobrevivieron sin inconvenientes. En cuanto a la muerte de los ratones del grupo M13-GHL, un estudio reciente ha informado que la utilización de péptidos con motivo RGD para el direccionamiento de liposomas podría causar una inmunotoxicidad dependiente de RGD (X. Wang et al., 2019). En nuestro caso, el péptido GHL posee un motivo RGD en su estructura, y se observó además respuestas inflamatorias en los órganos de la cavidad peritoneal de los primeros ratones fallecidos como consecuencia de la inoculación del fago M13-GHL, por lo que se sospecha que hubo una reacción inmuno-tóxica en estos ratones similar a lo previamente descrito (X. Wang et al., 2019).

Este fenómeno fue dependiente de la cantidad de fago utilizado ya que, en un ensayo de inmunización, animales inoculados vía IP con una menor cantidad del fago M13-

GHL ( $1 \times 10^{12}$  fagos por ratón) no presentaron los efectos tóxicos (**Figura 13**). Así, se obtuvo una supervivencia del 100% de los ratones inoculados, sin signos de dolor, sufrimiento o estrés. Conforme a esto se decidió utilizar en los ensayos posteriores la cantidad de  $1 \times 10^{12}$  fagos por ratón vía IP.

Al analizar la respuesta de anticuerpo IgG total contra las proteínas del fago en los animales vacunados, pudimos observar que las señales de absorbancias fueron ligeramente mayores para el grupo M13KO7 en comparación con el grupo M13-GHL (**Figura 14.B**), estas diferencias no fueron significativas. Esto podría deberse a que la expresión del péptido GHL en la superficie del fago reduce el número de proteínas pVIII silvestre en la superficie del fago recombinante disminuyendo la posibilidad de una respuesta inmune contra pVIII silvestre (Perham, 1995). Similares resultados fueron encontrados al comparar la respuesta de anticuerpos anti-Fago generadas cuando los ratones cuando son inoculados con un fago silvestre, con un fago recombinante con un antígeno idiotipo de linfoma de células B en su superficie acoplada a pVIII, y finalmente cuando el mismo antígeno es conjugado químicamente a la proteína pVIII (Roehnisch et al., 2013). Otra importante observación es el hecho de que los refuerzos periódicos evitaron la caída de la señal de anticuerpos, en contraste con lo que se observa en la **Figura 11.B**. Como era de esperarse, para el grupo TBS y para el grupo VaC, las señales de anticuerpos anti-fago se mantuvieron bajas en el transcurso de las semanas.

Los anticuerpos IgG total dirigidos contra el péptido GHL fueron determinados través de un ELISA en donde los pocillos de la placa fueron sensibilizados con AgV. Se obtuvo un aumento de absorbancia significativamente mayor para el grupo M13-GHL cuando se lo compara con el grupo M13KO7 (**Figura 15.A**). Aunque los resultados de la respuesta de IgG total anti-FMDV producida por el fago M13-GHL fueron menores que los de la vacuna comercial (**Figura 15.B**), ponen en evidencia su potencial para generar anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el sitio GHL de la proteína VP1. Además, debe considerarse que la formulación de la vacuna comercial está compuesta por virus inactivados en presencia de adyuvantes que potencian la respuesta inmune generada. Por lo tanto, para la utilización del fago M13-GHL como vacuna se debe optimizar la respuesta inmune. Para ello, existen muchas alternativas que podrían

mejorar y potenciar esta respuesta, tales como: la expresión conjunta de scFv en la proteína pIII para el direccionamiento a células dendríticas (Sartorius et al., 2011); la unión del péptido GHL al fago M13 por conjugación química, lo que podría generar una mayor densidad de antígeno en la superficie del fago sin comprometer la integridad del mismo (Roehnisch et al., 2013); también se podría utilizar formulaciones adyuvantes (Bastien et al., 1997a); entre otras.

Para evaluar el tipo de linfocitos Th que predomina luego de una inmunización, se ha realizado la determinación de los isotipos de anticuerpo IgG1 e IgG2a presentes en suero (Finkelman et al., 1990). En los ratones, la presencia de anticuerpos IgG1 indican un perfil de respuesta inmune direccionado hacia Th2, y la presencia de IgG2a está correlacionada con una respuesta del tipo Th1. Esto debido al perfil de citoquinas expresados por estos subtipos de células que a su vez conlleva a la producción de uno u otro isotipo de anticuerpos (Stevens et al., 1988). Por ejemplo, en un perfil de respuesta del tipo Th2 se libera interleucina (IL) 4, el cual induce la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgG1 específicas. En el perfil Th1, la presencia de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) induce linfocitos B para la producción de IgG2a específica de antígeno (Stevens et al., 1988). En este trabajo se ha encontrado una predominancia de anticuerpos del tipo IgG1 en los ratones inmunizados con M13-GHL, sugiriendo la inducción de un perfil de respuesta del tipo Th2 (**Figura 16** y **Figura 17**), el cual se caracteriza principalmente por el predominio de una respuesta inmune humoral (Mosmann & Sad, 1996; Paul & Seder, 1994). El péptido GHL utilizado en este trabajo constituye uno de los epítomos de linfocitos B con mayor capacidad de reconocimiento por anticuerpos (Tang et al., 2012), el mismo se encuentra entre los aminoácidos 140 y 160 de la proteína estructural VP1, siendo muy utilizado para el diseño de vacunas (Blanco et al., 2013; H.-B. Lee et al., 2017). Además, similar a nuestros resultados, en un trabajo anterior inmunizaron ratones con el péptido GHL conjugado a albúmina de suero bovino (BSA), utilizando como adyuvante toxina de cólera, y la respuesta de anticuerpos generada mostró una tasa de expresión IgG1/IgG2a de 22,5 (Beignon et al., 2005).

En este escenario, una alternativa prometedora podría ser la presentación simultánea de epítomos de linfocitos T de FMDV acoplado a la proteína pIII, en búsqueda a

generar una respuesta inmune más amplia (Blanco et al., 2013), además de la utilización de adyuvantes, como ya fue mencionado anteriormente.

Con el fin de analizar la inmunidad celular se procedió a evaluar *in vitro* la proliferación de linfocitos re-estimulados con el inmunógeno (Hurtado-Melgoza et al, 2016; Shi et al, 2006; Song et al, 2009; Y. Wang et al., 2014b). Esta técnica debe ser adaptada para los distintos ensayos debido a ciertas variables importantes que deben ser ajustadas tales como: la concentración de mitógeno, la densidad celular y el tiempo de incubación con el reactivo revelador (Koyanagi et al., 2016). La **Figura 18** muestra los resultados de la estandarización de estas variables, se definió la utilización de un tiempo de incubación de 24 horas con el revelador resazurina. Además, se determinó que al aumentar la densidad celular se logra una mejor sensibilidad del ensayo siendo consistentes con reportes anteriores en donde para la resazurina, un aumento de la concentración celular incrementa las señales de absorbancias obtenidas a 570 nm (Koyanagi et al., 2016).

Considerando los resultados de este ensayo (**Figura 19**), junto con los mostrados en la **Figura 18**, se ha concluido que la utilización de una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL, una incubación de 24 horas con el revelador resazurina y por último la utilización de ConA en una concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$  como control positivo de la inducción de proliferación de los esplenocitos son las condiciones experimentales óptimas para este ensayo. ConA es una lectina muy utilizada y conocida por su actividad estimuladora de la proliferación de linfocitos T de ratones, a través de su unión a estructuras glicosiladas en la superficie celular (Dwyer & Johnson, 1981).

Al analizar la presencia de una respuesta inmune celular contra el FMDV se pudo observar, utilizando AgV como estimulante, proliferación celular para los grupos inmunizados con M13-GHL y vacuna comercial, siendo mayor la significancia con 12,5  $\mu\text{g/mL}$  de AgV como inductor (**Figura 21**). El péptido GHL es un antígeno caracterizado principalmente por ser el mayor inmunógeno de FMDV capaz de generar anticuerpos neutralizantes, ya que se trata de un epítipo de linfocitos B (Tang et al., 2012), sin embargo la respuesta celular obtenida en ratones inmunizados con M13-GHL, confirma el hecho de que los fagos filamentosos podrían actuar como

potenciadores mejorando la presentación de antígenos en el MHC, lo que desencadena en una respuesta celular contra el antígeno (Liebert et al., 2003; Pozzo et al., 2010; Wan et al., 2005). Similares resultados fueron obtenidos recientemente utilizando el fago MS2 como transportador inmunogénico de una secuencia peptídica que contiene el epítipo DHL, con una proliferación de esplenocitos significativamente mayor en los ratones inmunizados con el epítipo transportado por el MS2 que en los ratones inmunizados con una repetición en tándem del epítipo (G. Wang et al., 2018).

Además, en la **Figura 21.B** se observa una proliferación celular mayor en los esplenocitos de los animales inmunizados con M13-DHL y M13KO7 cuando son estimulados con M13KO7, en comparación con los que fueron inoculados con TBS-glicerol y vacuna comercial. Esto sugiere la influencia del fago M13 como transportador inmunogénico capaz de provocar una respuesta celular.

Si bien la generación de anticuerpos neutralizantes es de gran importancia para la obtención de una inmunidad protectora contra el FMDV, la respuesta inmune celular también es un componente clave para una protección más efectiva (McCullough et al., 1992). Como ya se ha mencionado anteriormente, la presentación conjunta de un epítipo de linfocitos B y T del FMDV en la superficie del fago filamentoso podría ser una alternativa prometedora para obtener una mejor respuesta celular en búsqueda de una respuesta inmune más amplia (Blanco et al., 2013). La utilización de adyuvantes para las formulaciones de inmunización, entre otras opciones podría mejorar los niveles de respuesta humoral. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la utilización del fago filamentoso como transportador inmunogénico es un potente candidato para la obtención de vacunas recombinantes contra la fiebre aftosa, lo que a su vez está evidenciado por las múltiples alternativas que dispone esta tecnología, discutidas anteriormente y que podrían optimizar el vector viral de tal modo a generar una mejor respuesta

## 6 CONCLUSIONES

Se logró generar el fago recombinante M13-GHL capaz de expresar en su superficie, el péptido GHL de la proteína VP1 del FMDV acoplado a pVIII. Además, al ser reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb99 sugiere que el determinante antigénico se encuentra en una conformación similar a la de la partícula viral nativa del FMDV.

Los fagos M13-GHL fueron capaces de generar una respuesta inmune humoral tanto contra el fago como contra el FMDV cuando fueron inoculados en ratones de laboratorio. El isotipo IgG1 fue predominante sobre el isotipo IgG2a, lo que indica un perfil de respuesta inmune del tipo Th2, caracterizada principalmente por una respuesta humoral.

Además, la inmunización de ratones con el M13-GHL también logró una respuesta inmune celular contra el FMDV y contra el M13.

Es importante destacar que existen varias alternativas que podrían potenciar la respuesta inmune obtenida con el fago recombinante. Entre ellas se destacan la utilización de adyuvantes para la formulación, la incorporación conjunta de epítomos de linfocitos B y T en el fago recombinante y el direccionamiento de los fagos recombinantes a células dendríticas. Debido a los resultados prometedores obtenidos en este trabajo, se propone explorar estas alternativas a futuro, a fin incrementar la respuesta inmune contra la vacuna recombinante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., & Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337(6209), 709-716.
- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., & Majidi, J. (2016a). Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 66.
- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., & Majidi, J. (2016b). Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 66.
- Akira, S., Hashiguchi, S., Sugimura, K., Yamaguchi, Y., & Takeuchi, O. (2010). Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(1), 19-22.
- Arzt, J., Pacheco, J. M., & Rodriguez, L. L. (2010). The Early Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Cattle After Aerosol Inoculation. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1048-1063.
- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 787-796.
- Bahadir, A. O., & Balcioglu, B. K. (2011). *Phage Displayed HBV Core Antigen with Immunogenic Activity*. 1437-1447.
- Bahadir, A. O., Balcioglu, B. K., Uzyol, K. S., Hatipoglu, I., Sogut, I., Basalp, A., & Erdag, B. (2011). Phage displayed HBV core antigen with immunogenic activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(7-8), 1437-1447.
- Bakhshinejad, B., Karimi, M., & Khalaj-Kondori, M. (2015). Phage display: development of nanocarriers for targeted drug delivery to the brain. *Neural Regeneration Research*, 10(6), 862.
- Bar, H., Yacoby, I., & Benhar, I. (2008). Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC biotechnology*, 8(1), 37.
- Bastien, N., Trudel, M., & Simard, C. (1997a). Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology*, 234(1), 118-122. 2
- Bastien, N., Trudel, M., & Simard, C. (1997b). *Protective Immune Responses Induced*

*by the Immunization of Mice with a Recombinant Bacteriophage Displaying an Epitope of the Human Respiratory Syncytial Virus. 122(234), 118-122.*

- Bastien, N., Trudel, M., & Simard, C. (1997c). Protective Immune Responses Induced by the Immunization of Mice with a Recombinant Bacteriophage Displaying an Epitope of the Human Respiratory Syncytial Virus. *Virology*, 234(1), 118-122.
- Bayer, M. E., & Bayer, M. H. (1986). Effects of bacteriophage fd infection on Escherichia coli HB11 envelope: a morphological and biochemical study. *Journal of virology*, 57(1), 258-266.
- Becker, M., Felsberger, A., Frenzel, A., Shattuck, W. M. C., Dyer, M., Kügler, J., Zantow, J., Mather, T. N., & Hust, M. (2015). Application of M13 phage display for identifying immunogenic proteins from tick (Ixodes scapularis) saliva. *BMC Biotechnology*, 15(1), 43.
- Beignon, A.-S., Brown, F., Eftekhari, P., Kramer, E., Briand, J.-P., Muller, S., & Partidos, C. D. (2005). A peptide vaccine administered transcutaneously together with cholera toxin elicits potent neutralising anti-FMDV antibody responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104(3-4), 273-280.
- Belsham, G. J. (2005). Translation and Replication of FMDV RNA. En *Foot-and-Mouth Disease Virus* (Vol. 288, pp. 43-70). Springer-Verlag.
- Bennett, N. J., Gagic, D., Sutherland-Smith, A. J., & Rakonjac, J. (2011). Characterization of a dual-function domain that mediates membrane insertion and excision of Ff filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology*, 411(5), 972-985.
- Berryman, S., Clark, S., Monaghan, P., Jackson, T., & Virology, M. (2005). Early Events in Integrin v6-Mediated Cell Entry of Foot-and-Mouth Disease Virus. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 79(13), 8519-8534.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lerner, R. A., Rowlands, D. J., & Brown, F. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298(5869), 30-33.
- 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. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1-9.
- Braun, L. J., Tyagi, A., Perkins, S., Carpenter, J., Sylvester, D., Guy, M., Kristensen, D., & Chen, D. (2009). Development of a freeze-stable formulation for vaccines

- containing aluminum salt adjuvants. *Vaccine*, 27(1), 72-79.
- Brigati, J. R., & Petrenko, V. A. (2005). Thermostability of landscape phage probes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(6), 1346-1350.
- Brooksby, J. (1982). Portraits of Viruses: Foot-and-Mouth Disease Virus. *Intervirology*, 18(1-2), 1-23.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G. A., Fry, E. E., Stuart, D. I., & Jackson, T. (2006). Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for  $\alpha$  Integrins. *Journal of Virology*, 80(19), 9798-9810.
- Calendar, R., & MyiLibrary. (2006). *The bacteriophages: Vol. 2nd ed.* Oxford University Press.
- Cao, J. (2000). Helicobacter pylori-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1474(1), 107-113.
- Cao, Y., Lu, Z., & Liu, Z. (2016). Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems. *Expert Review of Vaccines*, 15(6), 783-789.
- Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T.-W., Shawn Justement, J., Cohen, O. J., VanCott, T. C., Iwanicki, M., Lewis, M. G., Greenhouse, J., Barry, T., Venzon, D., & Fauci, A. S. (2001). Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nature Medicine*, 7(11), 1225-1231.
- Cheung, A., DeLamarter, J., Weiss, S., & Küpper, H. (1983). Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 48(2), 451-459.
- Clavijo, A., Sanchez-Vazquez, M. J., Buzanovsky, L. P., Martini, M., Pompei, J. C., & Cosivi, O. (2017). Current Status and Future Prospects to Achieve Foot-and-Mouth Disease Eradication in South America. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), 31-36.
- Cottam, E. M., Wadsworth, J., Shaw, A. E., Rowlands, R. J., Goatley, L., Maan, S., Maan, N. S., Mertens, P. P. C., Ebert, K., Li, Y., Ryan, E. D., Juleff, N., Ferris, N. P., Wilesmith, J. W., Haydon, D. T., King, D. P., Paton, D. J., & Knowles, N. J. (2008). Transmission Pathways of Foot-and-Mouth Disease Virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathogens*, 4(4), e1000050.
- Cui, J., Ren, H. J., Liu, R. D., Wang, L., Zhang, Z. F., & Wang, Z. Q. (2013). Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, 31(8), 1171-1177.
- Dalla Vedova, R., Wassermann, A., & Cadel, S. (1976). [Toxicological and

- pharmacological studies of glycerol]. *Archivio per le scienze mediche*, 133(1), 71-84.
- De Berardinis, P., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R. N., Del Pozzo, G., & Guardiola, J. (2000). Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nature Biotechnology*, 18(8), 873-876.
- Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R., & Galfrè, G. (1997). Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, 15(11), 1276-1285.
- Deng, L., Ibañez, L. I., Van den Bossche, V., Roose, K., Youssef, S. A., de Bruin, A., Fiers, W., & Saelens, X. (2015a). Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages. *Plos One*, 10(5), e0126650.
- Deng, L., Ibañez, L. I., Van den Bossche, V., Roose, K., Youssef, S. A., de Bruin, A., Fiers, W., & Saelens, X. (2015b). Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages. *Plos One*, 10(5), e0126650.
- Di Marzo Veronese, F., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E., & Perham, R. N. (1994). Structural Mimicry and Enhanced Immunogenicity of Peptide Epitopes Displayed on Filamentous Bacteriophage. *Journal of Molecular Biology*, 243(2), 167-172.
- Doel, T. R. (2003). FMD vaccines. *Virus research*, 91(1), 81-99.
- Dwyer, J. M., & Johnson, C. (1981). The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. En *Clin. exp. Immunol* (Vol. 46).
- Fang, J., Wang, G., Yang, Q., Song, J., Wang, Y., & Wang, L. (2005). The potential of phage display virions expressing malignant tumor specific antigen MAGE-A1 epitope in murine model. *Vaccine*, 23(40), 4860-4866.
- FAO. (2012). *La fiebre aftosa provoca enormes pérdidas económicas en Paraguay / Agronoticias: Actualidad agropecuaria de América Latina y el Caribe / Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- FAO and OIE; Animal Production and Health Division. (2012). *The global foot and mouth disease control strategy: strengthening animal health systems through improved control of major diseases*.
- Finkelman, F. D., Holmes, J., Katona, I. M., Urban, J. F., Beckmann, M. P., Park, L. S., Schooley, K. A., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., & Paul, W. E. (1990). Lymphokine Control of In Vivo Immunoglobulin Isotype Selection. *Annual Review of Immunology*, 8(1), 303-333.

- Fischer, D., Rood, D., Barrette, R. W., Zuwallack, A., Kramer, E., Brown, F., & Silbart, L. K. (2003). Intranasal Immunization of Guinea Pigs with an Immunodominant Foot-and-Mouth Disease Virus Peptide Conjugate Induces Mucosal and Humoral Antibodies and Protection against Challenge. *Journal of Virology*, 77(13), 7486-7491.
- Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfré, G., Cortese, R., Monaci, P., & Nicosia, A. (1994). A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *The EMBO journal*, 13(9), 2236-2243.
- Fox, G., Parry, N. R., Barnett, P. V., McGinn, B., Rowlands, D. J., & Brown, F. (1989). The Cell Attachment Site on Foot-and-Mouth Disease Virus Includes the Amino Acid Sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic Acid). *Journal of General Virology*, 70(3), 625-637.
- Frenkel, D., Katz, O., & Solomon, B. (2000). Immunization against Alzheimer's beta-amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11455-11459.
- Fry, E. E., Newman, J. W. I., Curry, S., Najjam, S., Jackson, T., Blakemore, W., Lea, S. M., Miller, L., Burman, A., King, A. M. Q., & Stuart, D. I. (2005). Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A1061 alone and complexed with oligosaccharide receptor: Receptor conservation in the face of antigenic variation. *Journal of General Virology*, 86(7), 1909-1920.
- Gao, Y., Sun, S.-Q., & Guo, H.-C. (2016). Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal*, 13(1), 107.
- Grabowska, A. M., Jennings, R., Laing, P., Darsley, M., Jameson, C. L., Swift, L., & Irving, W. L. (2000a). Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology*, 269(1), 47-53.
- Grabowska, A. M., Jennings, R., Laing, P., Darsley, M., Jameson, C. L., Swift, L., & Irving, W. L. (2000b). Immunisation with Phage Displaying Peptides Representing Single Epitopes of the Glycoprotein G Can Give Rise to Partial Protective Immunity to HSV-2. *Virology*, 269(1), 47-53.
- Grubman, M. J., & Baxt, B. (2004). *Foot-and-Mouth Disease*. 17(2), 465-493. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.465>
- Hashemi, H., Bamdad, T., Jamali, A., Pouyanfar, S., & Mohammadi, M. G. (2010). Evaluation of humoral and cellular immune responses against HSV-1 using genetic immunization by filamentous phage particles: A comparative approach to conventional DNA vaccine. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 440-444.

- Henry, K. A., Arbabi-Ghahroudi, M., & Scott, J. K. (2015). Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Frontiers in Microbiology*, 6(August), 1-18.
- Hunter, P. (2011). The return of the phage. *EMBO reports*, 13(1), 20-23.
- Hurtado-Melgoza, M. L., Ramos-Ligonio, A., Álvarez-Rodríguez, L. M., Meza-Menchaca, T., & López-Monteon, A. (2016). Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 1-10.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. (s. f.). Recuperado 31 de enero de 2019, de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/)
- Israel, D. I. (1985). PCR-based Method for Screening Libraries. En *Media* (pp. 351-358).
- Jamal, S. M., & Belsham, G. J. (2013). Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary Research*, 44(1), 116.
- James, A. D., & Rushton, J. (2002). The economics of foot and mouth disease. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21(3), 637-644.
- Jelinek, R., Terry, T. D., Gesell, J. J., Malik, P., Perham, R. N., & Opella, S. J. (1997). NMR structure of the principal neutralizing determinant of HIV-1 displayed in filamentous bacteriophage coat protein. *Journal of Molecular Biology*, 266(4), 649-655.
- Kim, W.-G., Song, H., Kim, C., Moon, J.-S., Kim, K., Lee, S.-W., & Oh, J.-W. (2016). Biomimetic self-templating optical structures fabricated by genetically engineered M13 bacteriophage. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 853-859.
- Kneissel, S., Queitsch, I., Petersen, G., Behrsing, O., Micheel, B., & Dübel, S. (1999). Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (Inoviridae). *Journal of Molecular Biology*, 288(1), 21-28.
- Knight-Jones, T. J. D., McLaws, M., & Rushton, J. (2017). Foot-and-Mouth Disease Impact on Smallholders - What Do We Know, What Don't We Know and How Can We Find Out More? *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1079-1094.
- Knight-Jones, T. J. D., & Rushton, J. (2013a). The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3-4), 161-173.

- Knight-Jones, T. J. D., & Rushton, J. (2013b). The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3-4), 161-173.
- Kotecha, A., Wang, Q., Dong, X., Ilca, S. L., Ondiviela, M., Zihe, R., Seago, J., Charleston, B., Fry, E. E., Abrescia, N. G. A., Springer, T. A., Huiskonen, J. T., & Stuart, D. I. (2017). Rules of engagement between  $\alpha\beta 6$  integrin and foot-and-mouth disease virus. *Nature Communications*, 8(1), 15408.
- Koyanagi, M., Kawakabe, S., & Arimura, Y. (2016). A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1489-1498.
- Kruisbeek, A. M., Assays, V., & Function, M. L. (2000). Isolation of Mouse Mononuclear Cells. En J. E. Coligan (Ed.), *Current Protocols in Immunology* (pp. 3-7).
- Lee, H.-B., Piao, D.-C., Lee, J.-Y., Choi, J.-Y., Bok, J.-D., Cho, C.-S., Kang, S.-K., & Choi, Y.-J. (2017). Artificially designed recombinant protein composed of multiple epitopes of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 33.
- Lee, J. H., Warner, C. M., Jin, H. E., Barnes, E., Poda, A. R., Perkins, E. J., & Lee, S. W. (2017). Production of tunable nanomaterials using hierarchically assembled bacteriophages. *Nature Protocols*, 12(9), 1999-2013.
- Liebert, M. A., Gaubin, M., Fanutti, C., Mishal, Z., Durrbach, A., Berardinis, P. D. E., Sartorius, R., Pozzo, G. D. E. L., Guardiola, J., Perham, R. N., & Piatier-tonneau, D. (2003). *Processing of Filamentous Bacteriophage Virions in Antigen-Presenting Cells Targets Both HLA Class I and Class II Peptide Loading Compartments*. 22(1), 11-18.
- Malik, P., & Perham, R. N. (1996). New vectors for peptide display on the surface of filamentous bacteriophage. *Gene*, 171(1), 49-51.
- Maree, F. F., Blignaut, B., de Beer, T. A. P., Visser, N., & Rieder, E. A. (2010). Mapping of amino acid residues responsible for adhesion of cell culture-adapted foot-and-mouth disease SAT type viruses. *Virus Research*, 153(1), 82-91.
- Martín-Acebes, M. A., González-Magaldi, M., Sandvig, K., Sobrino, F., & Armas-Portela, R. (2007). Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology*, 369(1), 105-118.
- Marvin, D. A., Symmons, M. F., & Straus, S. K. (2014). Structure and assembly of filamentous bacteriophages. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 114(2), 80-122.

- Marvin, D. A., Welsh, L. C., Symmons, M. F., Scott, W. R. P., & Straus, S. K. (2006). Molecular structure of fd (f1, M13) filamentous bacteriophage refined with respect to X-ray fibre diffraction and solid-state NMR data supports specific models of phage assembly at the bacterial membrane. *Journal of Molecular Biology*, 355(2), 294-309.
- Mccullough, K. C., Simone, F. D. E., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R., & Kihm, U. (1992). Protective Immune Response against Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Virology*, 66(4), 1835-1840.
- Meador, M. M., & Balbi, M. J. (2019). *Global Agricultural Information Network*.
- Méndez-Scolari, J. E., Florentín-Pavía, M. M., Mujica, M. P., Rojas, N., & Sotelo, P. H. (2019). A qPCR Targeted Against the Viral Replication Origin Designed to Quantify Total Amount of Filamentous Phages and Phagemids. *Indian Journal of Microbiology*, 59(3), 365-369.
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R., & Galfrè, G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(7), 3162-3172.
- Morales, J., de Aluja, A. S., Martínez, J. J., Hernández, M., Rosas, G., Villalobos, N., Hernández, B., Blancas, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cervantes, J., Díaz, A., Fleury, A., Frago, G., Larralde, C., & Sciutto, E. (2011). Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: Simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. *Veterinary Parasitology*, 176(1), 53-58.
- Morales, J., Martínez, J. J., Manoutcharian, K., Hernández, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonhabau, H., de Aluja, A. S., Frago, G., Larralde, C., & Sciutto, E. (2008). Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*, 26(23), 2899-2905.
- Mosmann, T. R., & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, 17(3), 138-146.
- Motti, C., Nuzzo, M., Meola, A., Galfrè, G., Felici, F., Cortese, R., Nicosia, A., & Monaci, P. (1994). Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. *Gene*, 146(2), 191-198.
- Naranjo, J., & Cosivi, O. (2013). Elimination of foot-and-mouth disease in South America: lessons and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1623), 20120381.

- 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. *Journal of Comparative Pathology*, 141(2-3), 98-112.
- O'Donnell, Vivian, Larocco, M., & Baxt, B. (2008). Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 82(18), 9075-9085.
- OIE. (2013). *Foot and mouth disease. Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References aetiology*.
- OIE. (2019a). *Infección por el virus de la fiebre aftosa*.
- OIE. (2019b). *Lista de los Miembros libres de fiebre aftosa: OIE - World Organisation for Animal Health*. <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/lista-de-los-miembros-libres-de-fiebre-aftosa/#c10803>
- OIE. (2020a). *Foot and mouth disease : OIE - World Organisation for Animal Health*. <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/foot-and-mouth-disease/>
- OIE. (2020b). *OIE - World Organisation for Animal Health*. <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/es-fmd-carte/>
- Pacheco, J. M., Arzt, J., & Rodriguez, L. L. (2010). Early events in the pathogenesis of foot-and-mouth disease in cattle after controlled aerosol exposure. *The Veterinary Journal*, 183(1), 46-53.
- Paul, W. E., & Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76(2), 241-251.
- Perham, R. (1995). Engineering a peptide epitope display system on filamentous bacteriophage. *FEMS Microbiology Reviews*, 17(1-2), 25-31.
- Pfaff, E. (1988). Analysis of Neutralizing Epitopes Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*, 62(6), 2033-2040.
- Pfaff, E., Mussgayl, M., Bohm1, H. O., Schulz2, G. E., & Schaller, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus Communicated. *The EMBO Journal*, 1(7), 869-874.
- Pozzo, G. Del, Mascolo, D., Sartorius, R., Citro, A., Barba, P., D'apice, L., & De Berardinis, P. (2010). Triggering DTH and CTL Activity by fd Filamentous Bacteriophages: Role of CD4+ T Cells in Memory Responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 6. <https://doi.org/10.1155/2010/894971>

- Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, P., Galfrè, G., Cortese, R., Nicosia, A., & Monaci, P. (1996). Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *156*(11), 4504-4513.
- Puntoriero, G., Meola, A., Lahm, A., Zucchelli, S., Ercole, B. B., Tafi, R., Pezzanera, M., Mondelli, M. U., Cortese, R., Tramontano, A., Galfrè, G., & Nicosia, A. (1998). Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *The EMBO Journal*, *17*(13), 3521-3533.
- Racaniello, V. R. (2007). *Picornaviridae: the viruses and their replication*. Fields virology.
- Rassy, D., Bobes, R. J., Rosas, G., Anaya, V. H., Brehm, K., Hernández, B., Cervantes, J., Pedraza, S., Morales, J., Villalobos, N., de Aluja, A. S., Lacleste, J. P., Nunes, C. M., Biondi, G. F., Fragoso, G., Hernández, M., & Sciutto, E. (2010). Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. *PLoS one*, *5*(6), e11287.
- Rodriguez, L. L., & Grubman, M. J. (2009). Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, *27*, D90-D94.
- Roehnsch, T., Then, C., Nagel, W., Blumenthal, C., Braciak, T., Donzeau, M., Böhm, T., Bourquin, C., & Oduncu, F. (2013). Chemically linked phage idiotype vaccination in the murine B cell lymphoma 1 model. *Journal of Translational Medicine*, *11*(1), 267.
- Roehnsch, T., Then, C., Nagel, W., Blumenthal, C., Braciak, T., Donzeau, M., Böhm, T., Flaig, M., Bourquin, C., & Oduncu, F. S. (2014). Phage idiotype vaccination: first phase I/II clinical trial in patients with multiple myeloma. *Journal of translational medicine*, *12*, 119.
- Rweyemamu, M., Maree, F., Kasanga, C., Scott, K., Opperman, P., Chitray, M., Sangula, A., Sallu, R., Sinkala, Y., Wambura, P., King, D., & Paton, D. (2014). Challenges and prospects for the control of foot-and-mouth disease: an African perspective. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, *5*, 119.
- Sartorius, R., Pisu, P., D'Apice, L., Pizzella, L., Romano, C., Cortese, G., Giorgini, A., Santoni, A., Velotti, F., & De Berardinis, P. (2008). The use of filamentous bacteriophage fd to deliver MAGE-A10 or MAGE-A3 HLA-A2-restricted peptides and to induce strong antitumor CTL responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(6), 3719-3728.
- Sartorius, R., Trovato, M., Del Pozzo, G., Bettua, C., Russo, D., Barba, P., Caivano, A., Sartorius, R., D'Apice, L., Zanoni, I., De Berardinis, P., Granucci, F., & Mascolo, D. (2011). Vaccination with filamentous bacteriophages targeting DEC-205 induces DC maturation and potent anti-tumor T-cell responses in the

absence of adjuvants. *European Journal of Immunology*, 41(9), 2573-2584.

- Sciutto, E., Rosas, G., Hernández, M., Morales, J., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Blancas, A., Acero, G., Hernández, B., Cervantes, J., Bobes, R. J., Goldbaum, F. A., Huerta, M., Diaz-Orea, A., Fleury, A., de Aluja, A. S., Cabrera-Ponce, J. L., ... Larralde, C. (2007). Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*, 25(8), 1368-1378.
- Shah, J. A., Darrah, P. A., Ambrozak, D. R., Turon, T. N., Mendez, S., Kirman, J., Wu, C.-Y., Glaichenhaus, N., & Seder, R. A. (2003). Dendritic Cells Are Responsible for the Capacity of CpG Oligodeoxynucleotides to Act as an Adjuvant for Protective Vaccine Immunity Against *Leishmania major* in Mice. *The Journal of Experimental Medicine The Journal of Experimental Medicine* •, 198(2), 281-291.
- Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17-55.
- Shi, X. J., Wang, B., Zhang, C., & Wang, M. (2006). Expressions of Bovine IFN- $\gamma$  and Foot-and-Mouth Disease VP1 antigen in *P. pastoris* and their effects on mouse immune response to FMD antigens. *Vaccine*, 24(1), 82-89.
- Sidhu, S. S. (2000). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(6), 610-616.
- Slavov, N. (2015). *Chloroform Methanol Purification of Proteins* (Vol. 13, Número 5, pp. 865-873).
- Smeal, S. W., Schmitt, M. A., Pereira, R. R., Prasad, A., & Fisk, J. D. (2016). Simulation of the M13 life cycle I: Assembly of a genetically structured deterministic chemical kinetic simulation. *Virology*, 500, 259-274.
- Song, X., Bao, S., Wu, L., & Hu, S. (2009). Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine*, 27(1), 51-55.
- Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., & Vitetta, E. S. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature*, 334(6179), 255-258.
- Tang, H., Liu, X. S., Fang, Y. Z., Pan, L., Zhang, Z. W., Zhou, P., Lv, J. L., Jiang, S. T., Hu, W. F., Zhang, P., Wang, Y. L., & Zhang, Y. G. (2012). The Epitopes of Foot and Mouth Disease. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(12), 1261-1265.

Thermo Fisher Scientific. (2008). *alamarBlue*® Assay.

Ulivieri, C., Citro, A., Ivaldi, F., Mascolo, D., Ghittoni, R., Fanigliulo, D., Manca, F., Baldari, C. T., Pira, G. L., & Del Pozzo, G. (2008). Antigenic properties of HCMV peptides displayed by filamentous bacteriophages vs. synthetic peptides. *Immunology Letters*, *119*(1-2), 62-70.

Van Hauten, N. E., Zwick, M. B., Menendez, A., & Scott, J. K. (2006). Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine*, *24*(19), 4188-4200.

van Houten, N. E., Henry, K. A., Smith, G. P., & Scott, J. K. (2010). Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. *Vaccine*, *28*(10), 2174-2185.

Wan, Y., Wu, Y., Zhou, J., Zou, L., Liang, Y., Zhao, J., Jia, Z., Engberg, J., Bian, J., & Zhou, W. (2005). Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments. *European Journal of Immunology*, *35*(7), 2041-2050.

Wang, C. Y., Chang, T. Y., Walfield, A. M., Ye, J., Shen, M., Chen, S. P., Li, M. C., Lin, Y. L., Jong, M. H., Yang, P. C., Chyr, N., Kramer, E., & Brown, F. (2002a). Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, *20*(19-20), 2603-2610.

Wang, C. Y., Chang, T. Y., Walfield, A. M., Ye, J., Shen, M., Chen, S. P., Li, M. C., Lin, Y. L., Jong, M. H., Yang, P. C., Chyr, N., Kramer, E., & Brown, F. (2002b). Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, *20*(19-20), 2603-2610.

Wang, C. Y., Lynn, S., Jong, M.-H., Lin, Y.-L., Chang, T.-Y., Walfield, A., Wang, A., Wang, J., & Sia, C. (2004). *Full Protection in Pigs against FMDV Challenge following Single Dose of Synthetic Emergency FMD Vaccine*.

Wang, G., Liu, Y., Feng, H., Chen, Y., Yang, S., Wei, Q., Wang, J., Liu, D., & Zhang, G. (2018). Immunogenicity evaluation of MS2 phage-mediated chimeric nanoparticle displaying an immunodominant B cell epitope of foot-and-mouth disease virus. *PeerJ*, *2018*(5), 1-17.

Wang, L., Hu, Y., Li, W., Wang, F., Lu, X., Han, X., Lv, J., & Chen, J. (2016). Identification of a peptide specifically targeting ovarian cancer by the screening of a phage display peptide library. *Oncology letters*, *11*(6), 4022-4026.

Wang, X., Wang, H., Jiang, K., Zhang, Y., Zhan, C., Ying, M., Zhang, M., Lu, L., Wang, R., Wang, S., Burgess, D. J., Wang, H., & Lu, W. (2019). Liposomes with cyclic RGD peptide motif triggers acute immune response in mice. *Journal of Controlled Release*, *293*, 201-214.

- Wang, Y., Su, Q., Dong, S., Shi, H., Gao, X., & Wang, L. (2014a). Hybrid phage displaying SLAQVKYTSASSI induces protection against *Candida albicans* challenge in BALB/c mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*.
- Wang, Y., Su, Q., Dong, S., Shi, H., Gao, X., & Wang, L. (2014b). Hybrid phage displaying SLAQVKYTSASSI induces protection against *Candida albicans* challenge in BALB/c mice. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(4), 1057-1063.
- Willis, A. E., Perham, R. N., & Wraith, D. (1993). Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*, 128(1), 79-83.
- Wu, C.-H., Liu, I.-J., Lu, R.-M., & Wu, H.-C. (2016). Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 8.
- Yabu, Y., Minagawa, N., Kita, K., Nagai, K., Honma, M., Sakajo, S., Koide, T., Ohta, N., & Yoshimoto, A. (1998). Oral and intraperitoneal treatment of *Trypanosoma brucei brucei* with a combination of ascofuranone and glycerol in mice. *Parasitology International*, 47(2), 131-137.
- Yang, Q., Wang, L., Lu, D., Gao, R., Song, J., Hua, P., & Yuan, D. (2005). Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune responses against systemic candidiasis in C57BL/6 mice. *Vaccine*, 23(31), 4088-4096.
- Zhang, L., Zhang, J., Chen, H., Zhou, J., Ma, L., Ding, Y., & Liu, Y. (2011). Research in advance for FMD Novel Vaccines. *Virology Journal*, 8(1), 268.
- Zhong, Y., Cai, J., Zhang, C., Xing, X., Qin, E., He, J., Mao, P., Cheng, J., Liu, K., Xu, D., & Song, H. (2011). Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. *Virology Journal*, 8(1), 542.