

Título: Efecto adyuvante y seguridad de Cliptox™ en la respuesta inmune protectora inducida por una vacuna inactivada contra el virus de la fiebre aftosa en ratones.

Autores: Alexander. Batista Duharte (a.batista@toxi.scu.sld.cu) *, Valeria. Quattrocchi**, Valeria. Olivera^{b***}, Cecilia. Langellotti****, Juan .Sebastian. Pappalardo**, S. Di Giacomo**, Claudia. Mongini***, Deivys. Portuondo*, Patricia. Zamorano****.

Centros de procedencia: * Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Santiago de Cuba, Cuba; ** Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto de Virología, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina; *** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina; ****Universidad de Salvador, Buenos Aires, Argentina.

Palabras claves: adyuvantes, vacuna, Cliptox, FMDV, protección, toxicidad

Publicado en *Vaccine* 28 (2010): 6361–6366 (versión original). Factor de impacto: 3.616

Premio de la Instancia Nacional del Concurso

Resumen:

Cliptox™ es una micropartícula mineral del tipo zeolita clinoptilolita que ha mostrado actividad adyuvante contra diferentes antígenos. La fiebre aftosa es una enfermedad aguda causada por el virus de la fiebre aftosa (FMDV), el cual causa importantes pérdidas económicas por lo que es necesario obtener una vacuna que estimule una respuesta inmune rápida y de larga duración. En este estudio se evaluaron los efectos de Cliptox™, formulación adyuvante obtenida a partir de una zeolita cubana, en la magnitud y tipo de inmunidad inducida en respuesta a una vacuna inactivada del FMDV. Se demostró que FMDV-Cliptox™ estimula una respuesta de anticuerpos específica detectada en mucosa y en el suero. Los diferentes isótopos estimulados por inoculación con esta vacuna indicaron un perfil de respuesta Th1/Th2. También hubo un incremento en las células dendríticas y macrófagos en el bazo en comparación con la vacuna de FMDV inactivada. La formulación evidenció ser no tóxica en el modelo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (HET-CAM) y además incrementó la protección en un reto contra el FMDV activo en un modelo murino. Nuestros resultados evidencian que la incorporación de Cliptox™ en una vacuna inactivada del FMDV induce un incremento en la respuesta inmune protectora y claramente indica que Cliptox™ ejerce una activación importante de células dendríticas y macrófagos por lo que puede ser un candidato a adyuvante en vacunas para la inducción de respuestas inmunes protectoras.

Introducción:

La falta de adyuvantes seguros y potentes que estimulen el sistema inmune mucosal y sistémico y que ejerzan una efectiva presentación del antígeno in vivo limita dramáticamente el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales eficaces. Varios estudios han evidenciado que las micropartículas son eficaces en favorecer la presentación antigénica en formulaciones vacunales induciendo una potente respuesta inmune celular y humoral. Además, estos sistemas pueden proteger los antígenos contra las condiciones agresivas del medio como el pH bajo, sales biliares y enzimas. Las zeolitas son micropartículas de aluminosilicatos, con una acción inmunoestimuladora no específica, que actúan como superantígenos con la capacidad de activar grandes poblaciones de células T (5–20%), así como la inmunidad humoral [1]. Específicamente, las propiedades como inmunoestimuladores fueron demostradas por Ryu y Shaey [2,3] quienes reportaron que suspensiones del parásito *Trypanosoma gambiense* formuladas con zeolita indujeron protección significativa contra el desafío con el patógeno activo.

Nuestros primeros resultados han demostrado las propiedades adyuvantes de una micropartícula natural zeolita tipo clinoptilolita (Cliptox™), empleando dos antígenos T-dependientes clásicos (la ovoalbumina y hematófagos de carnero). Inyecciones subcutáneas de

ratones con estos antígenos formulados con Cliptox™ indujeron títulos altos de anticuerpos específicos, con efectos irrelevantes en el sitio de inoculación. Además, Cliptox™ ha demostrado tener la capacidad de generar una adecuada respuesta inmune mucosal contra antígenos exógenos [4,5].

La fiebre aftosa es una enfermedad viral aguda, muy contagiosa. Es económicamente importante debido a las restricciones internacionales que impone a la comercialización ganadera. La vacunación con el FMDV inactivo en las regiones endémicas puede reducir significativamente el impacto de la enfermedad [6]. En el modelo del ratón de infección de FMDV, Borca et al. [7] demostraron que las células B son principalmente responsables de la respuesta primaria, y que la respuesta inmune protectora es T-independiente. Recientemente Juleff y colaboradores [8] confirmaron estos resultados obtenidos en ratones, y demostraron que FMDV puede inducir una respuesta de anticuerpos T CD 4+ independiente de manera rápida y específica, así como un cambio de clase en la respuesta de anticuerpos, en el ganado inicialmente no protegido.

Este trabajo tiene como objetivo analizar la eficacia de la zeolita cubana (Cliptox™) como adyuvante en vacunas conteniendo virus inactivo de fiebre aftosa. En este reporte, presentamos importantes evidencias con respecto a las propiedades inmunoadyuvantes de Cliptox™ y la eficacia para inducir protección contra el virus de la fiebre aftosa serotipo O1C en un modelo murino, así como la inocuidad del producto.

2. Materiales y métodos

2.1. Ratones: Fueron usados ratones Balb/c entre 8 y 12 semanas de edad, suministrados por la Escuela de Veterinaria, de La Plata, Argentina. El cuidado y el trabajo con los animales fue realizado siguiendo las normas directivas institucionales.

2.2. Virus: El virus Binary Ethylenimine (BEI) - desactivado (FAi) (gentilmente suministrado por Biogénesis, Buenos Aires) fue empleado en la formulación vacunal experimental y en las pruebas ELISA. El virus contagioso, O1Campos Serotype, sirvió para el desafío viral y fue suministrado por SENASA (Buenos Aires). Todos los estudios que contemplaron virus contagioso fueron realizados en las instalaciones de NBS 3A SENASA.

2.3. Toxicidad: La toxicidad local de la formulación de FMDV- Cliptox™, fue evaluado por el HET-CAM método en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), de Santiago Cuba, Cuba. El estudio se llevó a cabo mediante el Protocolo No. 47 de INVITTOX de la base de datos ERGATT/FAME de Técnicas in vitro en Toxicología. ISSN 0960-2194, Russell & Burch House, 96-98 North Sherwood Street. Nottingham NG1 4EE. England. Se utilizaron huevos embrionados de gallinas de la raza White Leghorn, con un peso entre 50 y 60 g. Los reactivos empleados fueron NaCl al 0,9% para el lavado de la membrana, así como NaOH a 0,1 N y SDS al 1% como controles positivos. Brevemente, previo mantenimiento de los huevos a una temperatura de $37,5 \pm 0,5$ °C y una humedad relativa de $62,5 \pm 7,5\%$, hasta que alcanzaron los 10 días de incubación. Se abrió cuidadosamente el cascarón por la cámara de aire ya marcada, para exponer la membrana blanca, la cual se humedeció con una solución de NaCl al 0,9%. se retiró dicha membrana cuidadosamente con material quirúrgico oftálmico, evitando dañar la MCA que quedó expuesta y se evaluó su integridad y utilidad para ser usada. Se procedió a añadir las soluciones estándar de irritación (sustancias de referencia); se observaron las reacciones de hemorragia, lisis (desintegración de los vasos) y coagulación (desnaturalización de las proteínas intra y extravasculares) por un tiempo de 5 min. y se registró el tiempo en segundos en que apareció cada una para calcular el índice de irritación (I.S.)

Los productos vacunales a evaluar fueron colocados en la membrana corioalantoidea cubriendo al menos la mitad de la superficie descubierta, velándose la reacción a los 5 min, después de cuál fue cuidadosamente lavado con NaCl de 0.9 %. La severidad de las

reacciones anteriormente citadas (hemorragia, lisis y coagulación) fue evaluado según el procedimiento descrito en INVITTOX 47 protocolo, 1992 (9). Este procedimiento ha sido validado por el Centro Europeo para la Validación de los Métodos Alternativos (ECVAM), Ispra, Italia.

2.4. Formulaciones vacunales y vacunación: Se prepararon dos tipos de formulaciones vacunales: 0.5g de FMDV desactivado en Tampón Fosfato Salino (PBS) (iFMDV), y la misma formulación con 1 µg de Cliptox™ en PBS (FMDV-Cliptox™) mezclándose cuidadosamente. Grupos de 10 ratones Balb/c fueron inmunizados una vez (en el día 0), denominándose: (iFMDV)a y (Cliptox-FMDV)a; o dos veces (en el día 0 y 7) denominándose: (iFMDV)b y (Cliptox-FMDV)b por vía subcutánea, con un volumen de 0.2 ml. Otros animales (controles) recibieron: 1 µg Cliptox™, o PBS.

2.5. Reto viral: La protección contra el FMDV en el modelo del ratón está definida por la presencia o la ausencia de viremia 24 h después de la infección (15-17). Brevemente, los ratones fueron inoculados i.p. a los 21 días postvacunación (dpv) con virus contagioso 104.5 TCID₅₀ serotipo O1C. Después de 24 h, los animales fueron anestesiados y sangrados a través de la vena retroorbital. La sangre heparinizada fue colocada en placas 48 pozos conteniendo monocapas de la línea celular BHK-21 e incubado para 40 min a 37 grados Celsius en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Luego, los monoestratos celulares fueron lavados tres veces con PBS estéril. Después se agregó medio DMEM fresco suplementado con suero fetal de ternera (FCS) y se incubó por 48 h a 37 grados Celsius con CO₂ al 5 %. Se consideró que los animales estaban protegidos si el monoestrato de la célula no presentó efectos citopáticos después de un pasaje ciego. En cada prueba de desafío del viral, los animales inoculados con PBS estéril fueron incluidos como controles positivos de infección. Estos controles siempre tuvieron viremia detectable. Los porcentajes de protección se calcularon como 100 × (ratones protegidos / ratones retados).

2.6. Determinación de anticuerpos específicos contra FMDV: Se utilizó un ELISA en fase líquida, según Hambling y coll (1986). Brevemente, las placas Immulon IIHB se recubrieron la noche antes a 4 °C con anticuerpos anti FMDV de conejo diluido a concentración óptima en amortiguador de bicarbonato de carbonato, pH 9.6. Después de lavarse con 0.05 % Tween-20 / PBS, las placas fueron bloqueadas con (PBS Tween con % PBST/ ovoalbúmina al 1% (amortiguador bloqueador) por 30 minutos a 37° C. El suero de los ratones fue diluido en serie (1:10) con amortiguador bloqueador y se agregó una cantidad fija de antígeno viral. Después de 1 h de incubación a 37° C en agitación continua, las mezclas suero conteniendo anticuerpos/virus fueron transferidas a las placas bloqueadas, e incubadas 1 h a 37° C. Se añadió suero de curiel anti FMDV se diluido de manera óptima en PBS/suero bovino normal 2 %/ suero de conejo normal al 2 % , para la detección, seguido por incubación 1 h a las 37° C. Las placas fueron lavadas y se agregó el conjugado IgG anticuriel conjugado con peroxidasa diluido en el mismo amortiguador, seguido de incubación 1 h a 37° C. Ortho-phenylenediamine (1,2-benzenediamine) dihydrochloride (la SIGMA) (OPD) /H₂O₂ fue usado como sustrato de la peroxidase y leída la absorbancia a 492nm en un lector de microplacas MR 5000. Se incluyeron controles positivos y negativos adecuados cada una de las determinaciones. Los títulos de anticuerpos fueron expresados como el logaritmo negativo de la dilución más alta de suero que causa una inhibición de desarrollo de color mayor del 50 % en los valores medios de las muestras controles.

2.7. Detección de anticuerpos anti FMDV IgA en saliva por ELISA: Placas Maxisorp fueron revestidas desde la noche antes a 4° C con suero de conejo anti FMDV diluido en amortiguador carbonato – bicarbonato a pH 9.6. Después de tres lavados, las placas fueron bloqueadas con solución bloqueadora de polyvinylpyrrolidone (0.5MNaCl; 0.01M buffer fosfato; Tween-20 al 0.05 %; 1mM EDTA; polyvinylpyrrolidone al 1 %, pH 7.2) por 60 min. a 37° C y luego se agregó el FMDV desactivado en la dilución óptima en PBST. Las placas fueron incubados a 37° C por 30 min. Después las muestras de saliva se diluyeron 1:2 en la solución

bloqueadora. A la hora de incubación a 37° C, se lavaron las placas y se agregó una dilución óptima de conjugado antiratón IgA biotinconjugado (Caltag). Las placas fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente y luego lavadas. Se agregó el conjugado de peroxidasa (HRP)-streptavidin y después de 1 incubación h a temperatura ambiente, se agregó OPD – H₂O₂ como sustrato de la enzima. La reacción se detuvo usando a 1,25M H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas MR 5000 (Labsystems). Las salivas de controles positivos y negativos fueron incluidas en cada placa.

2.8. Determinación de isótopos de anticuerpos: Placas Inmulon II se recubrieron la noche antes a 4° C con suero del conejo anti FMDV diluidas en amortiguador carbonato – bicarbonato pH 9.6. Después de tres lavados, se agregó FMDV desactivado en una dilución óptima en PBST. Las placas fueron incubadas a 37° C por 30 min, y luego bloqueadas con solución de polyvinylpyrrolidone (a las 37° C por 45 min). Las muestras de suero (1:150) se agregaron a las placas e incubadas 2 h a temperatura ambiente y luego lavadas. Se agregó el conjugado antiratón biotin isotipo específico (Caltag) y se incubó por 1 h temperatura ambiente. Después de los lavados las placas fueron primero incubadas con streptavidin conjugado a HRP por 1 h a temperatura ambiente, y luego con OPD – H₂O₂, usando peroxidasa como sustrato. y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas MR 5000 (Labsystems). Muestras positivas de suero de control fueron incluidas en cada placa.

2.9 Purificación de células esplénicas: Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y disecados. Los bazoos fueron cuidadosamente extraídos y colocados en placas Petri estériles. Después de cortar sus extremos, se inyectó 2 ml de PBS suplementado con 10mM EDTA en cada bazo, para extraer las células de las cápsulas. Las células fueron centrifugadas, contadas en cámara Neubauer y se ajustaron a las concentraciones óptimas.

2.10 Citometría de flujo: Las suspensiones de células del bazo obtenidas dos días posvacunación fueron incubadas (15 min, 4° C) con diferentes anticuerpos marcados con FITC o Phycoerythrin (Bioscience) diluidos en PBS para evaluar la expresión de moléculas de superficie celular. Los siguientes anticuerpos fueron usados: CD11c/IA2 (MHC class II) y F4/80/Mac3 y sus controles correspondientes de isotipo. Después de lavar las células dos veces con PBS, los patrones de fluorescencia fueron analizados usando un FACScan citómetro de flujo (BD Biosciences) y el software CellQuest. Los resultados son expresados como porcentajes de células positivas.

2.11 Análisis estadístico: Los datos de protección fueron analizados por pruebas exactas Fisher. La prueba de análisis de varianza se usó para comparar los resultados de poblaciones celulares entre grupos. El grado de significación de diferencias en los niveles de IgA en saliva entre dos grupos si se realizó por la prueba de t student. El valor de la P < 0.05 fue considerado como un indicador de diferencias significativas.

3. Resultados:

3.1 La formulación con Cliptox™ no es tóxica

La toxicidad potencial de la formulación de Cliptox-FMDV fue probada en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo. El examen microscópico de estas membranas no exteriorizó diferencias con sus controles negativos, señalando la no existencia de efectos tóxicos de la formulación (Fig. 1).

3.2 La inmunización con Cliptox-FMDV confiere protección contra FMDV en ratones retados

Los ratones Balb/c fueron subcutáneamente inoculados con una o dos dosis de iFMDV o Cliptox-iFMDV y desafiado después de 21 dpv con FMDV activos. Sorprendentemente el 90 % de los ratones (n = 10) inmunizados dos veces con la formulación Cliptox-iFMDV fueron protegidos contra el reto con el virus activo medido por la presencia o la ausencia de viremia 24 h después de la infección. Por otra parte, sólo el 20 % del grupo vacunado con iFMDV estuvo protegido, mientras que todos los animales inmunizados con Cliptox™ o PBS, como controles negativos, no estuvieron protegidos (Tabla 1) ($p < 0,05$ para (Cliptox-iFMDV) b contra (iFMDV) grupo b medido por la prueba exacta Fisher). Ninguno de los ratones inmunizados con dosis única de cualquiera de las formulaciones estaban protegidos contra el desafío del virus activo (datos no mostrados).

Tabla 1: Niveles de protección inducidos en (iFMDV) b, (Cliptox-iFMDV) b o el grupo control. La protección contra el FMDV contagioso en el modelo del ratón está definida por la ausencia de viremia 24 h después de la infección, y está reflejada como porcentajes de animales protegidos en cada grupo (% de protección)

Group	% protection (n = 10)
(Cliptox-iFMDV)b*	90
(Ifmdv)b	20
(Cliptox™)b	0
Negative control (PBS)	0

$p < 0.05$ for (Cliptox-iFMDV)b versus (iFMDV)b medido por la prueba exacta de Fisher

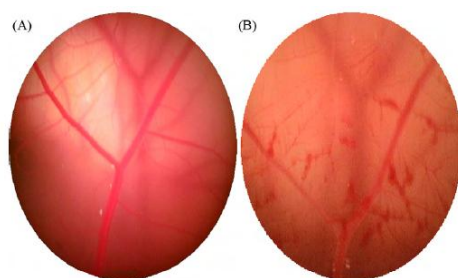


Fig. 1. Membrana corioalantoidea de embrión de pollo después de la aplicación de (A) Cliptox-iFMDV. Similar resultado fue observado en el control control negativo (B) iFMDV.

3.3. Niveles de anticuerpos anti FMDV inducidos por la vacuna en ratones Balb/c

Como se muestra en la Fig. 2, los ratones inmunizados subcutáneamente con (Cliptox-iFMDV) b o (iFMDV) mostraron títulos de anticuerpos específicos a iFMDV ($p < 0.05$) mayores comparados con ratones que recibieron una sola inoculación con la mismas formulaciones. No hubo diferencias significativas observadas entre los grupos (Cliptox-iFMDV) b o (iFMDV) b, aunque el valor medio fue superior en los animales inmunizados con (Cliptox-iFMDV) b.

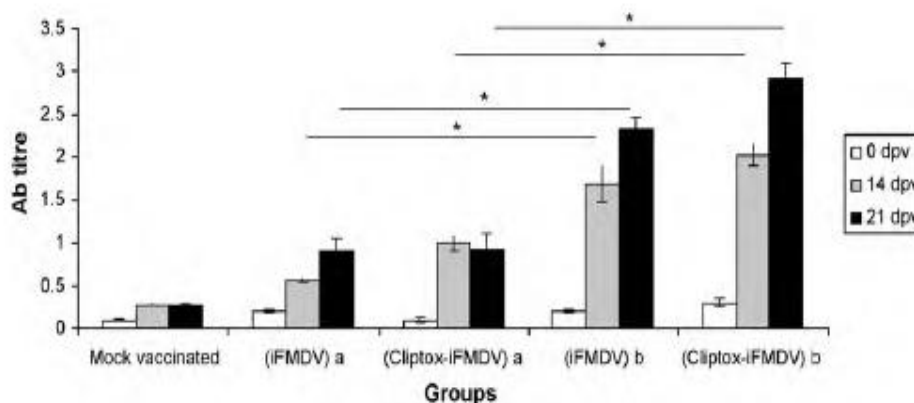


Fig 2. Respuesta del título de anticuerpos inducida en ratones en diferentes días posvacunación detectados por ELISA. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre (iFMDV)a y (iFMDV)b a las 14 y 21 dpv o (Cliptox-IFMDV)a y (Cliptox-IFMDV)b a las 14 y 21 dpv.

3.4. Isotipos de anticuerpos específicos contra FMDV en ratones vacunados

Los isotipos de IgG producidos en animales vacunados fueron analizados a los 21 dpv. Los sueros de ratones del grupo (Cliptox-IFMDV)b exhibieron un incremento significativo de isotipos IgG2a e IgG2b ($p < 0.05$) en comparación con los sueros del grupo (iFMDV)b. Los títulos de IgG1 también se elevaron en el día 21 del experimento, pero esta diferencia no fue significativa entre estos dos grupos (Fig. 3. Es interesante que a las 12 y 21 dpv, la IgA en pruebas de saliva estuvieron fueron significativamente aumentados en el grupo (Cliptox-IFMDV) en relación al grupo (iFMDV)b ($p < 0.005$). Fig 4.

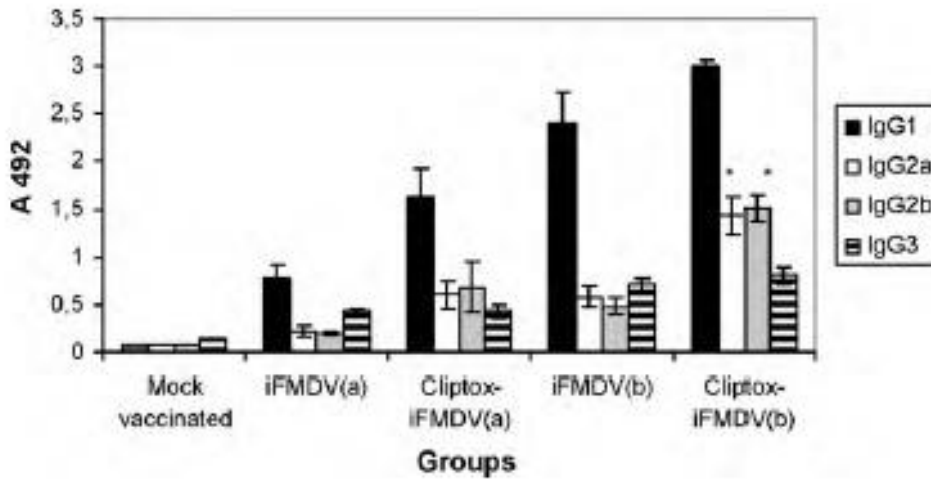


Fig 3 Isotipos IgG específicos inducidos por la vacunación con diferentes formulaciones en ratones Balb/c a los 21 dpv. *Las diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación al grupo (iFMDV)a, (Cliptox-IFMDV) y el grupo (iFMDV) b

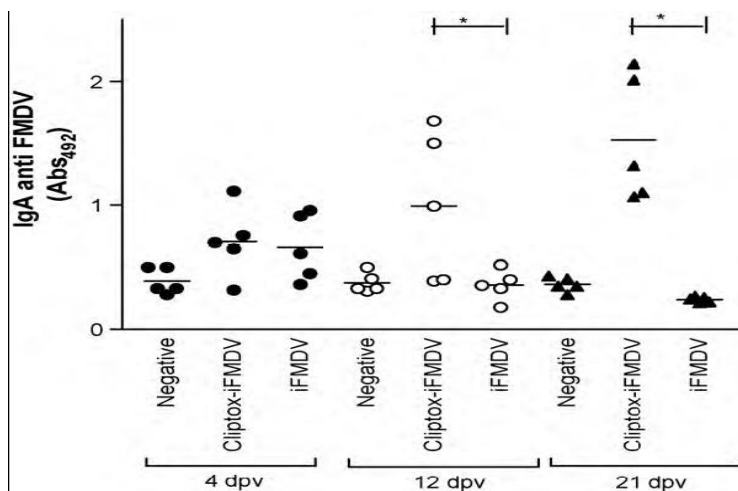
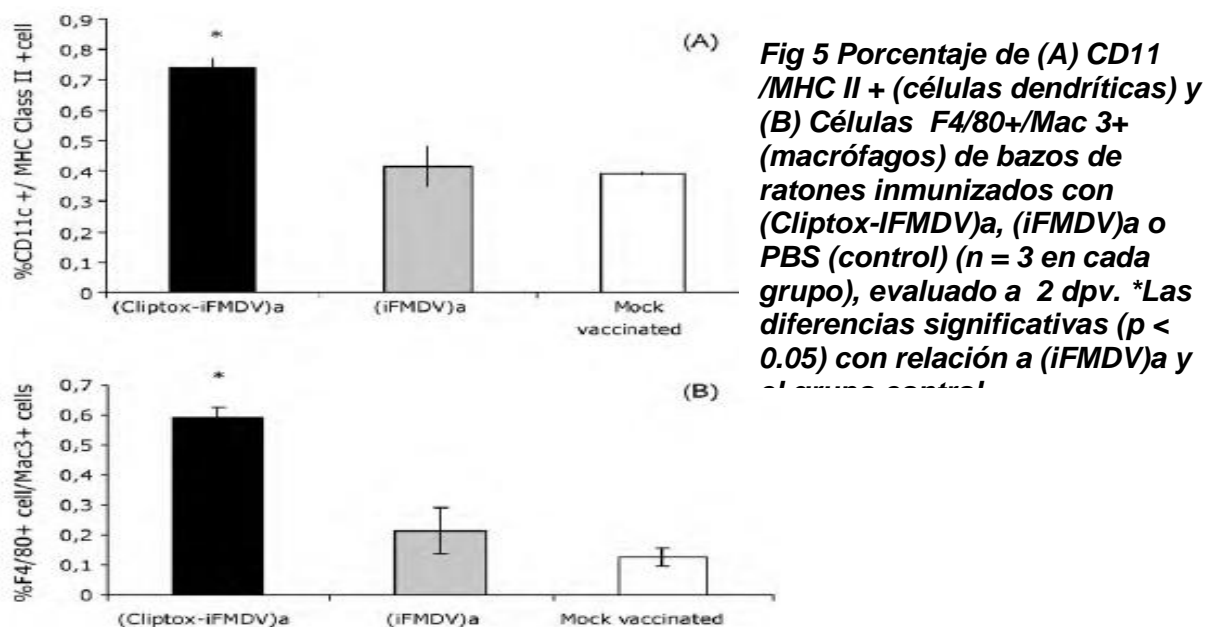


Fig. 4. Respuesta específica IgA salival para FMVD evaluada en diferentes tiempos en Balb/c machos inmunizados subcutáneamente con (iFMVD)b, (Cliptox-IFMVD)b o PBS (control). Cada punto representa los valores medios de absorbancia a $492 \pm SE$ de pruebas de saliva de 5 ratones por grupo en los días 4, 12 y 21 dpv. *Las diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación al grupo (iFMVD) b.

3.5. Efecto de vacunación de Cliptox-iFMVD en células dendríticas y subpoblaciones de macrófagos en el bazo

Los efectos tempranos de la estimulación inducida por las diferentes formulaciones fueron analizados en ratones a los 2 dpv. Con este fin, las células del bazo de los ratones controles y vacunados una vez (Cliptox-IFMVD)a y (iFMVD)a, fueron marcados con anticuerpos monoclonales específicos y analizados por citometría de flujo para cuantificar los porcentajes de células dendríticas (CD11c, MHC II positivas) y macrófagos células F4/80, Mac3 +). La fig. 5 muestra que la inmunización con Cliptox-iFMVD produjo una expansión significativa ($p < 0.05$) de las células dendríticas y poblaciones macrofágicas en el bazo en comparación con el grupo iFMVD.



4. Discusión:

En este estudio usamos un modelo de ratón para evaluar la respuesta de una nueva vacuna de iFMVD conteniendo una zeolita cubana: Cliptox, como adyuvante para inducir una respuesta inmune específica y protectora contra el FMDV. El modelo murino experimental usado se correlaciona con la respuesta inmune humoral y protectora contra FMDV en el ganado vacuno (7). La formulación de Cliptox-IFMVD produjo un incremento en la protección contra el desafío con FMDV en el modelo murino. Los diferentes perfiles de isotipos producidos como respuesta a la inoculación con esta vacuna indican una respuesta Th1/Th2. Los títulos de anticuerpos totales contra FMDV fueron similares en grupos de ratones que recibieron Cliptox-IFMVD y IFMVD, pero en el primer grupo, IgG2a e IgG2b estuvieron significativamente elevados. Es probable que estos isotipos de anticuerpos conjuntamente con los macrófagos estimulados por la formulación Cliptox-IFMVD, sean capaces, a través de la opsonofagocitosis, de proteger más eficazmente a los ratones del virus en comparación con el grupo inmunizado con IFMVD sin Cliptox™. Los niveles de IgG1, por otra parte, no difirieron significativamente en ambos grupos.

Se ha reportado que IgG2b, seguido por IgG1, son los isotipos predominantes en los anticuerpos anti IgG total específicos contra FMDV generados en ratones infectados por el virus entre 14 y 60 días post infección. Otros autores señalan que IgG2a e IgG2b son los isotipos más efectivos en la activación de complemento así como también en respuestas celulares mediadas por anticuerpos en ratón (18,19). El predominio del isotipo IgG2b en animales infectados estaría de acuerdo con la hipótesis de McCullough y col. (9), que propusieron que la protección efectiva contra FMDV es mediada a través de una fagocitosis de partículas virales favorecida por anticuerpos y efectuadas por células del sistema reticuloendotelial. En otros estudios se ha reportado un incremento de la resistencia al desafío viral a los 210 d.p.i. en animales vacunados con virus inactivado en formulaciones de aceite y Avridine (10), al igual que con el uso de LPS y la fracción soluble de la pared Mycobacterium incluidos en la formulación (11). Los valores de resistencia aumentada al desafío viral obtenidos con la inclusión de inmunomoduladores para ambos vehiculos, no mostraron una correlación muy clara con el índice de sero neutralización aunque para todas las formulaciones experimentales se registró un incremento de IgG2b. Nuestros resultados mostraron que el isotipo IgG2b fue predominante en el suero de los grupos de ratones inmunizados que presentaron un porcentaje alto de resistencia al desafío viral.

En este trabajo, también estudiamos la generación de anticuerpos específicos IgA en saliva contra FMDV inducido por la vacunación. Debido a que la inmensa mayoría de agentes patógenos entra al cuerpo a través de las superficies mucosales el uso de adyuvantes que inducen inmunidad en mucosas es altamente apreciado para la prevención efectiva de la infección. Generalmente se considera que una inmunidad efectiva en mucosas contribuirá a la protección contra la infección por FMDV. Esta hipótesis subraya la relevancia de la inducción observada en nuestro estudio de la inmunidad de mucosa (IgA en saliva) por la inmunización parenteral y ayuda a comprender la protección observada en animales susceptibles. La inducción de respuestas IgA ha estado correlacionada con protección completa contra el desafío en cerdos inmunizados con una vacuna inactiva altamente concentrada (12). Cubillos y col. (13) dieron cuenta de una correlación entre buena protección y la inducción de IgA lograda por una vacuna de péptido contra FMDV.

La inducción descrita de una respuesta específica IgA después de la vacunación subcutánea con Cliptox-IFMDV y su posible papel en la protección contra el desafío con FMDV merece profundizar en esta investigación y lo cual podría ser de utilidad en el desarrollo de futuras vacunas contra FMDV. Es bien sabido que la activación de células T y la liberación de citoquinas específicas estén involucradas en el proceso de activación de linfocitos B cambio de isotipo, y la expresión específica de las integrinas en células B sensibilizadas con antígenos. Ambas células Th1 y Th2 parecen contribuir al desarrollo de respuestas específicas IgA (14) El proceso de cambio de isotipo de las células B y la producción de células plasmáticas productoras de IgA comienza en los sitios inductivos mucosales. Tales eventos requieren señales específicas mediadas por moléculas coestimuladoras, incluyendo citoquinas y células T auxiliaoras. Después de la activación celular, las células productoras de IgA específicas emigran hacia la lámina propia de los sitios efectores de mucosa, diferentes a los sitios inductores iniciales.

En recientes experimentos, hemos detectado niveles aumentados de interleukina IL-2 e IFN gamma en esplenocitos de ratones inmunizados con Cliptox-IFMDV estimulados *in vitro* con virus desactivado, en comparación con el grupo iFMDV (datos no presentados). Estos datos, conjuntamente con los isotipos observados parecen señalar que la respuesta para la vacunación con Cliptox-IFMDV es principalmente de tipo Th1, con algunos componentes de Th2.

La formulación de Cliptox-IFMDV indujo un incremento en las células dendríticas y macrófagos en el bazo comparado con el grupo iFMDV. Nuestra hipótesis es que la formulación vacunal conteniendo el adyuvante podría promocionar la presentación del virus y de este modo

incrementar la respuesta inmune y la protección antiviral obtenida. Por otra parte, los receptores Fc promueven eficazmente la captación de complejos inmunes de FMDV por macrófagos (9,15,16), así como también por monocitos y células dendríticas plasmacitoides (pDC) (26). Un incremento de la captación viral ha sido observado en células transfectadas con el receptor Fc (17). El virus no es solamente captado e internalizado sino también se inicia la replicación viral aunque este proceso es ineficaz en macrófagos y células dendríticas (18)

Conclusión:

Cliptox™ ejerce una importante actividad adyuvante para vacunas contra FMDV, aumentando y modulando la respuesta inmune humoral y celular en ratones vacunados y aumenta la protección contra un desafío con virus activo. Además no es tóxico, siendo un candidato a adyuvante interesante para la inclusión en vacunas comerciales contra FMDV. Este resultado estimula continuar la evaluación de este nuevo candidato a adyuvante vacunal contra antígenos relevantes de patógenos que causan enfermedades en humanos.

Agradecimientos:

A Marta Radolci por su asistencia técnica, a N Fondevila por los análisis estadísticos y a O Zabal por el suministro de las líneas celulares. Este trabajo fue desarrollado gracias al **Proyecto SECYT (Argentina)-CITMA (Cuba)** (Nro CUPA03- SVIII/027) y el Proyecto INTA AESA.

Referencias bibliográficas

- 1) Ueki A, Yamaguchi M, Ueki H, Watanabe Y, Ohsawa G, Kinugawa K, et al. Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. *Immunology*. 1994;82(2):332–5.
- 2) Ryu E, Shaey KC. Protective effect of zeolite absorbed Trypanosoma gambiense inactive vaccines on mice. *International Journal of Zoonoses* 1980;7(2):101–6.
- 3] Ryu E, Shaey KC. Immunization of rabbits with zeolite absorbed Trypanosoma gambiense inactive vaccine. *International Journal of Zoonoses* 1981;8(1):91–6.
- 4) Batista DA, Fernandez M, Urdaneta I, Betancourt J, Perez O. Evidences of specific immunostimulating effect and low toxicity of a natural adjuvant candidate. In: 6° Latin American Congress of Immunology. 2002.
- 5] Batista DA, Portuondo DF, Betancourt J, Urdaneta L. Adjuvant effect and toxicity profile of a particulate natural product. *Vaccine* 2006;24S2 (S2/96–52/102).
- 6) Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Maradei E, Periolo O, Smitsaart E, Borca MV, et al. A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. *Veterinary Research Communications* 2000;24(4):261–73.
- 7] Borca MV, Fernandez FM, Sadir AM, Braun M, Schudel AA. Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* 1986;59(2):261–7.
- 8] Juleff N, Windsor M, Lefevre EA, Gubbins S, Hamblin P, Reid E, et al. Foot-and-mouth disease virus can induce a specific and rapid CD4+ T-cell-independent neutralizing and isotype class-switched antibody response in naive cattle. *Journal of Virology* 2009;83(8):3626–36.
- 9) Spielmann H. 1992 HET-CAM Test. The ERGATT/FRAME. Databank of *in vitro* techniques. INVITTOX; IP-47: 1-9.
- 10) McCullough KC, Parkinson D, Crowther JR. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 1988;65(2):187–91.

- 11) Berinstein A, Perez Filgueira M, Schudel A, Zamorano P, Borca M, Sadir A. Avridine and LPS from *Brucella ovis*: effect on the memory induced by foot-and-mouth disease virus vaccination in mice. *Vaccine* 1993;11(13):1295–301.
- 12) Berinstein A, Piatti P, Gaggino OP, Schudel AA, Sadir AM. Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium* sp. wall. *Vaccine* 1991;9(12):883–8.
- 13) Eble PL, Bouma A, Weerdmeester K, Stegeman JA, Dekker A. Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* 2007;25(6):1043–54.
- 14] Cubillos C, de la Torre BG, Jakab A, Clementi G, Borrás E, Barcena J, et al. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. *Journal of Virology* 2008;82(14):7223–30.
- 15) Zuercher AW. Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunology* 2003;16(3):279–89.
- 16) Baxt B, Mason PW. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology* 1995;207(2):503–9.
- 17] Rigden RC, Carrasco CP, Barnett PV, Summerfield A, McCullough KC. Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs. *Vaccine* 2003;21(13–14):1466–77.
- 18) Guzylack-Piriou L, Bergamin F, Gerber M, McCullough KC, Summerfield A. Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *European Journal of Immunology* 2006;36(7): 1674–83.
- 19) Mason PW, Baxt B, Brown F, Harber J, Murdin A, Wimmer E. Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology* 1993;192(2):568–77.