

Una nueva vacuna contra la neosporosis bovina: avances del desarrollo y perspectivas

Florencia Mansilla¹ y Alejandra Victoria Capozzo^{2*}

1- Investigadora del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

2- Investigadora Principal de CONICET. * capozzo.alejandra@inta.gob.ar

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas "IVIT", CONICET-INTA. Buenos Aires. Argentina

Resumen

La neosporosis causada por el parásito *Neospora caninum* (phylum *Apicomplexa*) es una de las principales causales de aborto en el ganado y, por lo tanto, un importante problema de salud veterinaria de gran relevancia económica. La vacunación se ha considerado una estrategia viable para prevenir la neosporosis bovina, sin embargo, no existen actualmente vacunas contra esta enfermedad en el mercado. El sistema inmune controla al parásito principalmente a través de la activación temprana de linfocitos T-CD4+ y la secreción de interferón gamma (IFN- γ). Este trabajo describe el desarrollo de una vacuna a subunidades que reduce la transmisión congénita de *N. caninum* y que resulta segura cuando es aplicada durante la preñez. Establecimos además condiciones para determinar de manera indirecta parámetros de protección frente a la transmisión congénita del parásito en bovinos y de eficacia vacunal en ratones. Hemos demostrado también que la adición de agonistas de receptores de señales de daño presentes en las células dendríticas constituyen herramientas sumamente útiles a la hora de modular el perfil de la respuesta inmune inducida por una vacuna contra *N. caninum* basada en proteínas. Este diseño es extrapolable a otras enfermedades causadas por protozoos de relevancia para la salud animal y humana.

Palabras clave: *Neospora caninum*, vacuna, modelos animales, bienestar animal.

Summary

Neosporosis caused by the parasite *Neospora caninum* (phylum *Apicomplexa*) is one of the main causes of abortion in cattle and, therefore, an important veterinary health problem of great economic relevance. Vaccination has been considered a viable strategy to prevent bovine neosporosis, however, there are currently no vaccines against this disease in the market. The immune system controls the parasite mainly through the early activation of CD4+ T-lymphocytes and the secretion of interferon gamma (IFN- γ). This work describes the development of

a subunit vaccine that reduces the congenital transmission of *N. caninum* and that is safe even when applied during pregnancy. We also established conditions to indirectly determine protection parameters against congenital transmission of the parasite in cattle and vaccine efficacy in mice. We have also shown that the addition of damage signal receptor agonists constitutes a successful tool for modulating the profile of the immune response induced by a protein-based vaccine against *N. caninum*. This design can be extrapolated to other diseases caused by protozoa of relevance to animal and human health.

Keywords: *Neospora caninum*, vaccine, animal models, animal welfare.

Introducción

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria que afecta a los bovinos, causada por el parásito *Neospora caninum* (Dubey 1996; Innes et al. 2002), considerada una de las principales causas de aborto a nivel mundial. Provoca además importantes pérdidas económicas, principalmente por bajas en la producción de carne y leche, aumento en la tasa de reposición, reducción de la tasa de crecimiento y aumento del intervalo parto-concepción (Innes et al. 2002). Los bovinos pueden infectarse a través de la ingesta de alimento contaminado con ooquistes presentes en las heces de perros u hospedadores definitivos en general (McAllister et al. 1998, De Marezet et al. 1999) o por infección congénita a través de la madre al feto por vía transplacentaria (Paré et al. 1996, Davison et al. 1999). La transmisión postnatal es responsable de menos del 15% de los casos de neosporosis en el campo (Hall et al. 2005).

Actualmente no existe ninguna vacuna comercial disponible contra la neosporosis. Recientemente se han publicado estudios utilizando vacunas vivas con variable éxito (Hemphill, 2016). Algunas vacunas basadas en antígenos nativos son eficaces contra enfermedades parasitarias, como CoxAbicTM, compuesta por antígenos purificados de gametocitos de *Eimeria* máxima (Sharman et al. 2010); y NobivacPiroTM, que confiere protección

contra la babesiosis en perros (Schetters 2009). El éxito de estas vacunas en prevenir enfermedades parasitarias es una prueba sólida de que las vacunas a subunidades pueden resultar efectivas, estimulando el desarrollo de formulaciones con antígenos recombinantes (Monney and Hemphill 2014). La clave consiste en lograr activar al sistema inmune innato generando las señales de daño adecuadas para que se desarrolle la respuesta adaptativa.

La activación de linfocitos T la realizan las células dendríticas (DCs) que distinguen a los patógenos a través de los receptores de señales de daño (PRRs), como los de tipo Toll (TLR) y CLR. El factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) es una proteína adaptadora común a varios receptores que controla la expresión de citoquinas proinflamatorias que conducen a la producción de IL-12 e IFN- γ , promoviendo la eliminación del parásito. Debido a su actividad estimuladora, los agonistas de PRRs pueden inmunomodular la respuesta global de las vacunas mediante la activación de las respuestas innata y adaptativa a través de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Kaisho 2002). En este sentido, la activación de un mayor número de PRRs a través de sus respectivos ligandos resulta en una más rápida translocación al núcleo del factor de transcripción kB (NF-kB) y la concomitante síntesis y secreción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (Koblansky et al. 2013).

En este estudio demostramos que una vacuna formulada con subunidades antigénicas solubles de taquizoítos muertos o subunidades y un adyuvantes con actividad inmuno-estimulante puede inducir protección contra la neosporosis bovina a través de la estimulación de mayor cantidad de receptores de tipo Toll que actúan por la vía MyD88 se relaciona con una mejor respuesta inmune contra *N. caninum*.

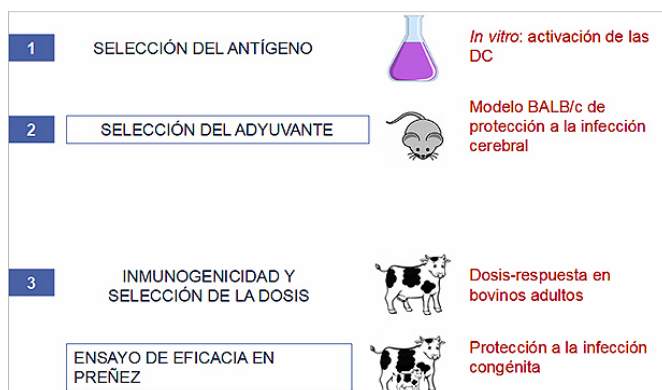


Figura 1: Diseño de las etapas de desarrollo de la vacuna contra la neosporosis bovina

Desarrollo

El desarrollo de este trabajo fue realizado en cuatro etapas cuyo objetivo principal fue minimizar el uso de animales al mínimo indispensable para poder registrar la vacuna. Las etapas del desarrollo preclínico se muestran en la figura 1.

1 Selección del antígeno vacunal

La selección del antígeno vacunal se realizó *in vitro*, según la capacidad de las diferentes preparaciones antigénicas de iniciar la respuesta inmune a través de la activación de las células dendríticas derivadas de médula ósea en cultivo con GM-CSF e IL.4 (DCs, Mansilla et al, 2012). Se evaluaron los siguientes antígenos: taquizoítos inactivados ("Taq. Muertos") y las fracciones soluble (sNcAg) e insoluble (iNcAg) de extractos de taquizoítos. Como parámetro de activación se determinó la capacidad de estos antígenos de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias en las DCs. El extracto soluble, sNcAg, indujo la producción de IL-6, TNF α y IL-2p70 ($p < 0.05$). La producción de IL-6 y TNF- α fue superior en las DCs estimuladas con sNcAg que para el resto de los antígenos ($p < 0.05$). Los taquizoítos muertos y el extracto insoluble (Fig.2) no estimularon la producción de citoquinas proinflamatorias, los valores obtenidos fueron similares a los de las DCs no tratadas (Mock). Ninguno de los tratamientos activó la expresión de IL-10 y no se observaron diferencias significativas en la síntesis de IFN γ (Fig. 19).

Vacuna basada en sNcAg: modelo murino: ratones BALB/C recibieron dos concentraciones de sNcAg (alta: 4 μ g y baja: 0,4 μ g) o extracto soluble de células VERO sin infectar como control negativo (4 μ g). Estas preparaciones antigénicas fueron formuladas con tres diferentes adyuvantes acuosos. -AVEC[®], adyuvante desarrollado por nuestro grupo de trabajo basado en lecitina de soja

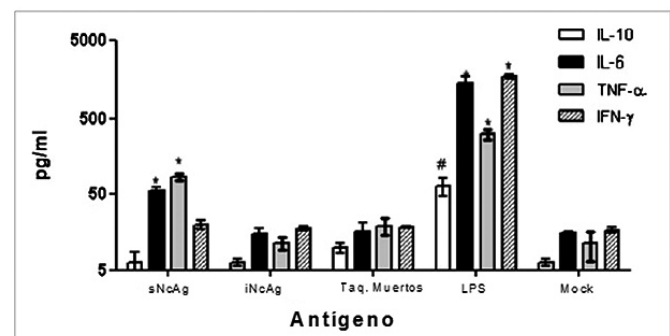


Figura 2. Producción de citoquinas proinflamatorias e IL-10 por citometría de flujo en el sobrenadante de cultivo de DCs tratadas con los diferentes antígenos. * Diferencias significativas respecto al control negativo ($p < 0.05$). # Se usó ConA como control positivo para IL-10.

suplementado con distintos activadores de TLRs y CL-RsÑ; hidróxido de aluminio (Rehidragel HPA, Reheis®, Nueva York, US) e ISCOMs (ISCOM matrix, Abisco-300, ISCONOVA. Uppsala, Suecia). Participaron en el ensayo 90 animales que fueron divididos en 9 grupos de 5 animales cada uno (Fig. 3). Los mismos grupos fueron replicados en paralelo, pero fueron sangrados a los 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 21 y 28 dpv y sacrificados a los 38 dpv.

La formulación de 0,4 µg de sNcAg+ AVEC indujo anticuerpos específicos después de dos dosis (21 dpv en adelante, Fig. 4B). Las formulaciones de 0,4 µg de sNcAg con ALUM o ISCOM no indujeron niveles cuantificables de anticuerpos antes del desafío. Después del desafío, todos los animales inmunizados con 0,4 µg de sNcAg, incluso aquellos que no presentaban anticuerpos antes de la infección, mostraron niveles de anticuerpos superiores a aquellos animales que no habían sido inmunizados

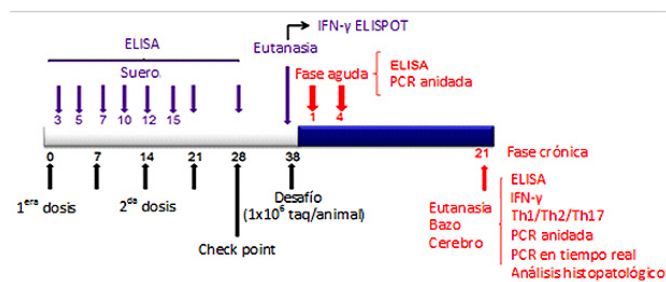


Figura 3 Esquema experimental del ensayo de protección en ratones (Mansilla et.al 2012)

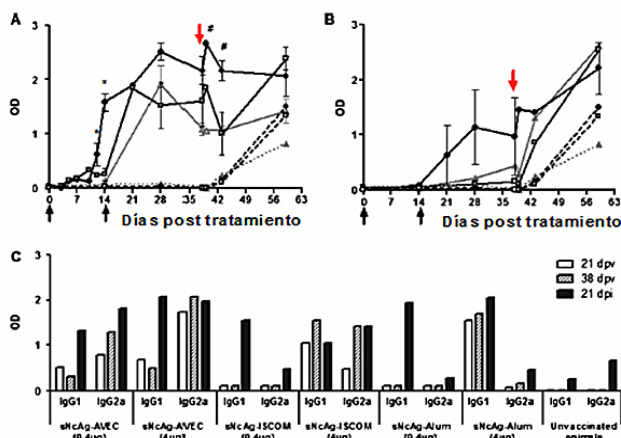


Figura 4. Respuesta humoral inducida por la vacunación. La cinética de los anticuerpos específicos se determinó por ELISA. Se muestran los valores promedio \pm DS de los animales inmunizados con 4 y 0,4 µg de antígeno (A y B, respectivamente). Las flechas en negro indican las inmunizaciones. La flecha roja indica el momento del desafío. (C) isotipos de IgG medidos por ELISA los 21 y 38 dpv. Referencias: sNcAg/AVEC, círculos llenos (línea llena); sNcAg/ISCOMs triángulos grises (línea llena), sNcAg /ALUM, cuadrados vacíos (línea llena). Los grupos placebo con los mismos adyuvantes, pero sin antígeno llevan los mismos símbolos, pero con líneas punteadas. *Diferencias significativas a los animales de los grupos control ($p < 0.05$). #Diferencias significativas respecto al ALUM y al ISCOM ($p < 0.05$).

(Fig. 4B). Estos niveles fueron similares para todos los animales vacunados a los 21 dpi (Fig. 4 A y B). A partir de los 9 dpv, se detectan Acs (IgG) específicos contra *N. caninum* en los ratones vacunados con una sola dosis de 4 µg de sNcAg/AVEC (no se muestra).

Los isotipos de IgG variaron según el adyuvante empleado (Fig. 4C). Las formulaciones que contenían AVEC indujeron IgG2a, y un perfil balanceado entre IgG1 e IgG2a después del desafío. Los animales del grupo sNcAg (4 µg)+ALUM produjeron mayores niveles de IgG1, y Ag+ ISCOM un perfil balanceado a los 38 dpv y 21 dpi. En los animales vacunados con las dosis bajas de antígeno (0,4 µg) y ALUM o ISCOM se observó una respuesta de IgG1 después del desafío, mientras que los animales control mostraron una mayor producción de IgG2a a los 21 dpi (Fig. 20C).

Las vacunas con 4 µg de sNcAg con ISCOM o AVEC indujeron la producción de IFN-γ en niveles superiores a los del grupo no vacunado (Fig. 5). Los animales inmunizados con 4 µg de sNcAg + AVEC evaluados a los 21 dpi fueron los que mostraron los niveles más elevados de IFN-γ ($p < 0,05$). También evaluamos la producción de otras citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos reestimulados con sNcAg. En los animales vacunados los niveles de IL-2 fueron elevados, característicos de una activa proliferación de células T. El nivel de IL-4 en los animales vacunados con ALUM fue superior a los de los otros grupos a los 38 dpv y a los 21 dpi. Los animales naive que fueron infectados no indujeron IL-6.

Todos los animales vacunados con sNcAg lograron controlar al parásito a los 4 dpi (tabla 1), evidenciando que la protección en fase aguda era independiente del adyuvante empleado. Por el contrario, el 80% de los animales de los grupos controles mostraron una elevada

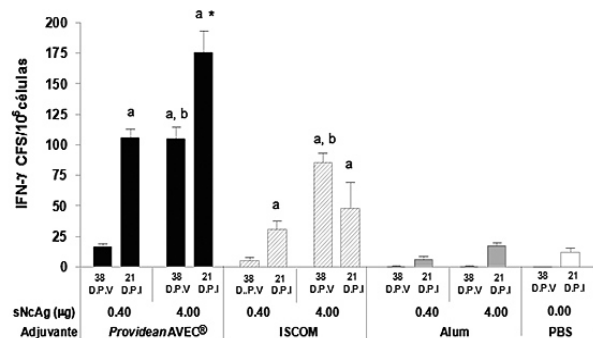


Figura 5. Producción de citoquinas en esplenocitos. La producción de IFN-γ se determinó por antes y después del desafío (38 dpv y 21 dpi). Los resultados se expresan como el número de células formadoras de spots (CFS) cada 10^6 células. (*) Mayor número de CFS- IFN-γ ($p < 0.05$) (a) diferencias significativas respecto a los controles. (b) el número de CFS- IFN-γ fue mayor en estos ($p < 0.05$).

carga parasitaria. Las formulaciones con 4 µg de sNcAg + ISCOM y ambas vacunas con AVEC fueron efectivas en el control de la infección en su fase crónica en el tejido cerebral. Los ratones inmunizados con formulaciones que contenían 0,4 µg de sNcAg mostraron mayor carga de parasitaria en relación con los otros grupos. La vacuna de 4 µg de sNcAg formulada con ALUM falló en prevenir la infección crónica. Se examinaron por microscopía múltiples secciones de diferentes regiones del cerebro en busca de lesiones que revelasen daño cerebral. A cada lesión se le asignó un valor numérico de acuerdo con el criterio de Ribeiro, et al. 2009 (Tabla 1) No se observaron lesiones en los animales que fueron inmunizados con 4 µg de antígeno/ISCOM, ni en ninguno de los dos grupos que recibieron vacunas formuladas con AVEC (4 o 0,4 µg de sNcAg). La respuesta inmune gatillada por estas formulaciones controló al parásito que en la fase aguda y limitó el establecimiento de la infección crónica.

Ensayo dosis-respuesta en bovinos: La formulación que resultó más efectiva en BALB/c (sNcAg/-AVEC®) se evaluó en el modelo bovino en una prueba para establecer la mínima dosis capaz de activar la respuesta inmune, manteniendo sustentabilidad a nivel comercial. Se evaluaron vacunas conteniendo 0, 10, 50 o 100 µg de sNcAg por dosis, formulado con -AVEC®. Como control se prepararon formulaciones con 100 µg de extracto so-

Tabla 1. Carga parasitaria estimada por PCR en tiempo real. A la derecha se asignan valores numéricos a las lesiones encontradas en el cerebro de los animales infectados según el análisis histopatológico (0: Sin daño; 1: meningitis leve; 2: meningitis moderada; 3: meningitis severa).

Vacuna	Carga parasitaria		Lesión cerebral
	Sangre (4 dpi)	Cerebro (21 dpi)	21 dpi
sNcAg 4 µg + ISCOM	1,67 ± 0,25	0,32 ± 0,13	0 (5/5)
sNcAg 0,4 µg + ISCOM	2,75 ± 1,02	3,34 ± 2,78	2 (2/5)
sNcAg 4 µg + AVEC	0,90 ± 0,12	0,40 ± 0,15	0 (5/5)
sNcAg 0,4 µg + AVEC	0,97 ± 1,37	0,54 ± 0,42	0 (5/5)
sNcAg 4 µg + ALUM	0,03 ± 0,05	4,52 ± 2,62	1 (2/5)
sNcAg 0,4 µg + ALUM	1,37 ± 0,44	5,00 ± 3,15	1 (4/5)
Grupos placebo	20,46 ± 11,22	8,45 ± 1,58	1 (3/5) 2 (1/5) 3 (1/5)

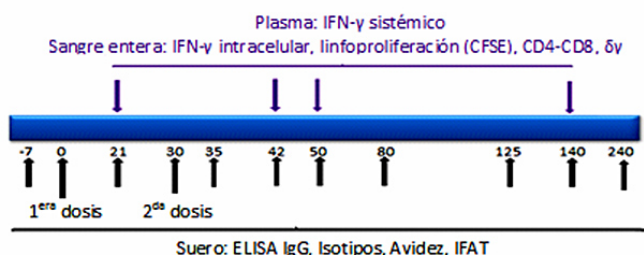


Figura 6. Diseño esquemático del ensayo de vacunas en bovinos.

luble de células VERO. Cada dosis, en un volumen final de 2 ml, se aplicó por vía subcutánea (SC) en la tabla del cuello. El diseño experimental se detalla en la fig. 6. Trabajo completo en Mansilla y col. 2013.

Los bovinos inmunizados con dosis más altas de antígeno respondieron más tempranamente y sus niveles de anticuerpos se mantuvieron por más tiempo (Fig.7). La avidéz de los anticuerpos también mostró un comportamiento dosis-dependiente. Todas las formulaciones vacunales evaluadas indujeron anticuerpos de alta avidéz luego de dos dosis. El isotipo predominante inducido por todas las formulaciones con sNcAg en bovinos fue IgG1. El análisis de la cinética de los anticuerpos mostró que el título de anticuerpos específicos en animales inmunizados con 50 y 100 µg de sNcAg se mantuvo superior al de los animales controles por más de dos meses luego de la segunda dosis.

Los niveles de IFN-γ, en cambio, tuvieron un pico a los 50 dpv y decayeron hasta los 140 dpv. En estos animales hubo un gran porcentaje de células T CD4+/ IFN-γ+ a los 50 dpv, que disminuyó a los 140 dpv pero todavía resultaba significativo (Fig. 8). Esto indica que la administración de dos dosis de 50 ó 100 µg de sNcAg/AVEC prima a las células T para que desarrollen una respuesta específica ante una reexposición a antígenos del parásito, por ejemplo durante la infección

Protección a la infección congénita: vaquillonas con

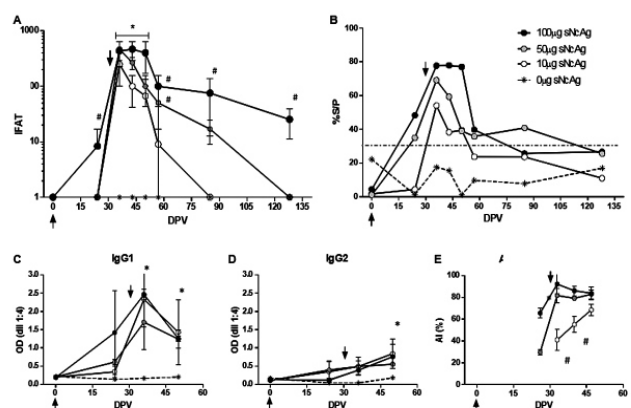


Figura 7. (A) Título de anticuerpos cuantificados por inmunofluorescencia indirecta (IFAT). (B) Cinética de anticuerpos determinada por ELISA. La línea de puntos indica del punto de corte del ensayo. Los niveles de IgG1 (C) e IgG2 (D) se determinaron por ELISA entre los días 0 y 50 post-vacunación. (E) La maduración de la avidéz de los anticuerpos se determinó en momento en que se detectó el pico máximo de anticuerpos totales (21, 42 y 50 dpv). Las inmunizaciones se señalan con flechas. * Diferencias significativas respecto a los animales vacunados con 10 µg de sNcAg (p<0,05). # Valores significativamente diferentes a los otros grupos (p<0,05).

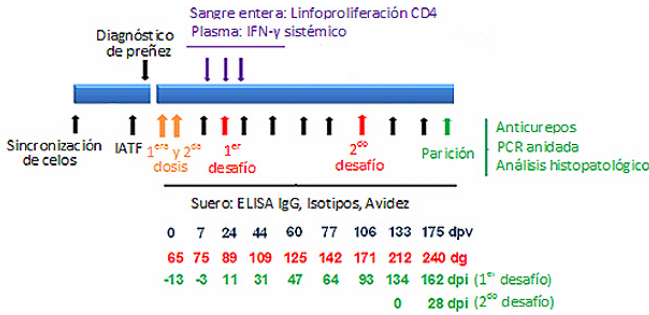


Figura. 10 Respuesta de anticuerpos en hembras preñadas inmunizadas a los 65 y 75 días de gestación (0 y 10 dpv, indicada en el gráfico con flechas negras). El desafío se realizó inoculando 1×10^8 taquizoitos vivos de la cepa Nc1 (IV) a los 78 ó 212 dg (13 y 147 dpv, respectivamente, indicados con flechas rojas). Los resultados se expresan como el porcentaje de reactividad promedio (\pm SD) relativo al control positivo provisto por el kit. La línea horizontal señala el punto de corte del ensayo.

diagnóstico positivo de preñez fueron asignados al azar a 4 grupos. Recibieron dos dosis de 2 ml con 50 μ g de sNcAg y AVEC[®] al 30% vía SC a los 65 y 75 días de gestación (dg); los animales de los grupos control recibieron el mismo volumen de PBS-AVEC[®]. El día del desafío se registró la temperatura rectal y se realizó ecografía para verificar el buen estado del feto (Mansilla et al, 2015). Luego recibieron una suspensión con 1×10^8 taquizoitos por vía endovenosa a los 78 ó 212 dg, según corresponda. Durante los primeros 4 días luego de la vacunación y la infección experimental se registró la temperatura rectal y se analizaron los sitios de inoculación en busca de

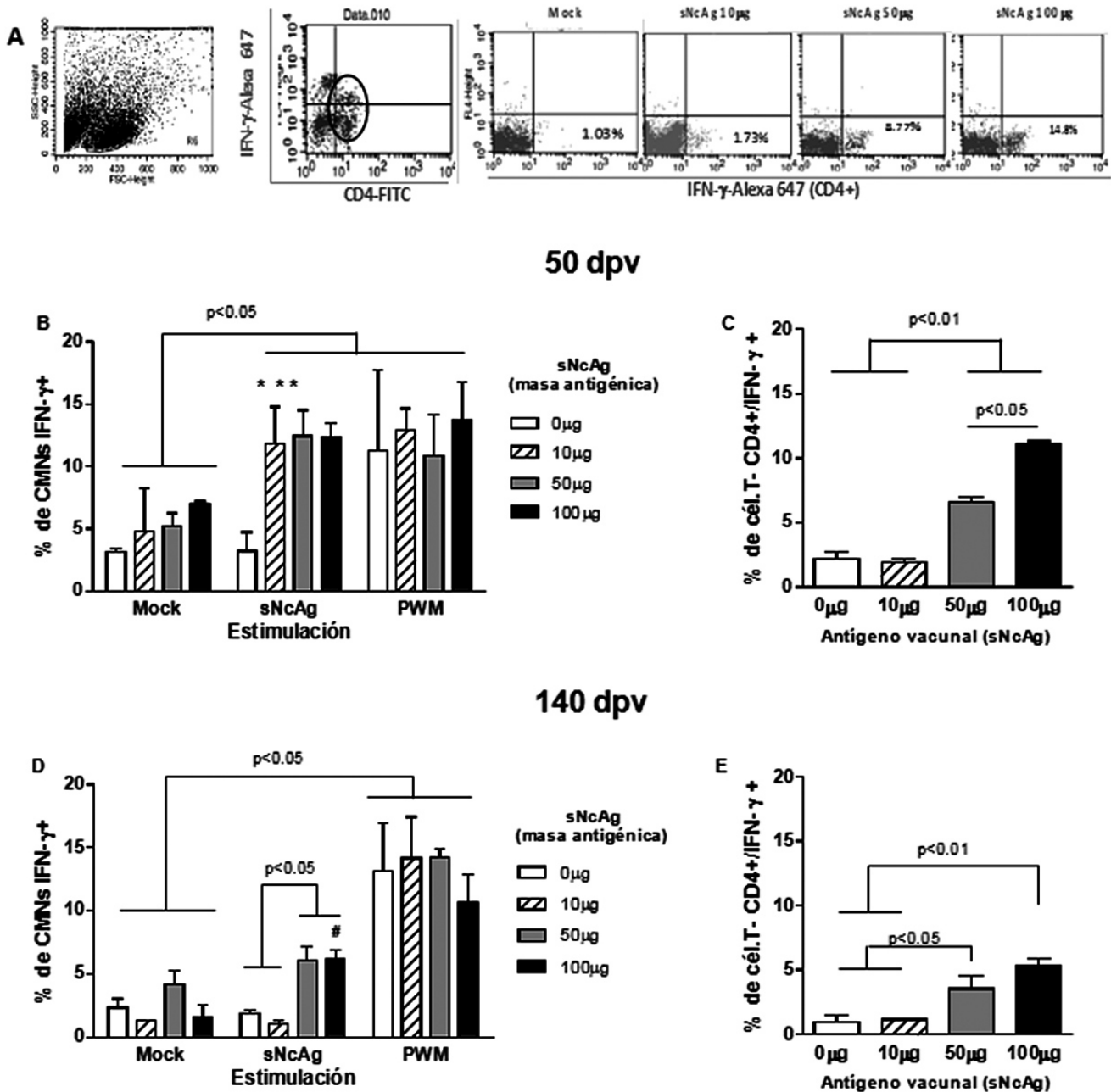


Figura. 9. Diseño esquemático del ensayo de protección al aborto en bovinos experimentalmente infectados con *N. caninum*.

lesiones. Regularmente se les realizaron ultrasonidos y exámenes clínicos para corroborar la viabilidad del feto. Se les tomaron muestras de suero o sangre entera a intervalos regulares hasta la parición para determinar la inmunogenicidad de la vacuna mediante distintas pruebas (Fig 9).

La vacunación indujo una respuesta inmune primaria, con incremento de los niveles de IgM a los 7 dpv (Fig 53A). La infección experimental a los 78 días de gestación (1^{er} desafío) indujo un marcado incremento del nivel

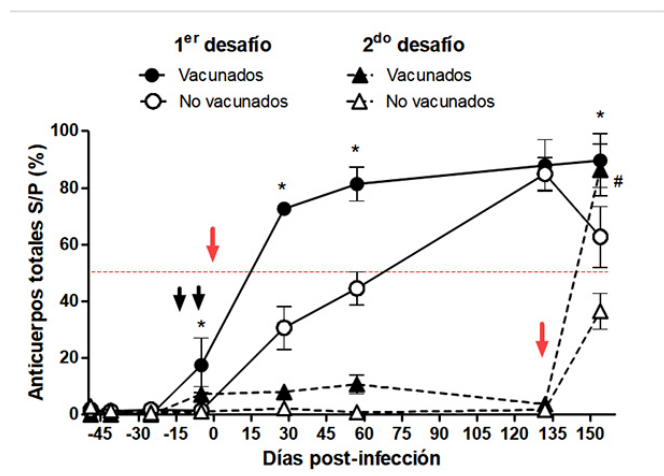


Figura 8. Identificación de CMNs y células T productoras de IFN- γ (valores promedio \pm DS por triplicado) luego de una estimulación con sNcAg a los 50 y 140 dpv. (A) Ensayo representativo Porcentaje de CMNs a los 50 dpv (B y C) y a los 140 dpv (D y E) productoras de IFN- γ . *Diferencias significativas respecto al grupo con 0 μ g sNcAg ($p < 0,05$). # superiores al control ($p < 0,05$).

Tabla 2. Títulos de IgG1 e IgG2a en muestras de suero evaluadas por ELISA en animales vacunados y no vacunados; 21 días luego del 1^{er} desafío y 28 días luego del 2^{do} desafío.

	Grupo	Animal	IgG1	IgG2
1 ^{er} desafío	Vacunado	1	200	> 200
		11	100	150
		15	200	> 200
		17	200	100
		19	200	> 200
	No vacunado	2	125	100
		4	50	50
		6	100	30
		10	100	>200
		12	50	25
2 ^{do} desafío	Vacunado	3	100	100
		5	150	25
		7	>200	50
		9	200	50
		13	>200	100
	No vacunado	14	50	25
		16	100	25
		18	100	50

de anticuerpos totales, que fue superior en los animales vacunados comparado con los no vacunados entre los 28 y 57 dpv ($p < 0,01$). Las vaquillonas preñadas desafiadas a los 212 días de gestación (2^{do} desafío) también mostraron niveles de anticuerpos superiores a los no vacunados a los 154 dpv ($p < 0,01$) (Fig. 10). El incremento del nivel de anticuerpos que se observa en los animales luego de la infección corresponde a una evidente respuesta secundaria. La avidéz de los anticuerpos inducidos en los animales vacunados e infectados luego del 1^{er} desafío fue significativamente superior en comparación a los animales naïve infectados a los 28 dpi y luego del segundo desafío (no se muestra).

Los animales inmunizados presentaron mayores títulos de IgG1 e IgG2 luego de la infección (en ambos desafíos), respecto a los animales naïve-infectados. Encontramos diferencias en los perfiles de IgG1 e IgG2 según el momento en que se realiza la infección experimental. Los animales vacunados desafiados en el 1^{er} trimestre de gestación presentaron un perfil balanceado, con títulos similares de IgG1 e IgG2, mientras que los no vacunados, en cambio, presentaron preferentemente IgG1. Por otro lado, los animales inmunizados y desafiados en el 3^{er} trimestre mostraron mayores niveles de IgG1 que IgG2, con un perfil similar a los no vacunados e infectados (tabla 2).

La inducción de la respuesta anamnésica de células T-CD4+ se determinó por citometría de flujo. Se observó que la vacunación con sNcAg indujo la proliferación de células T-CD4+ luego de una re-estimulación *in vitro* de las CMNs con el antígeno (0 dpi). Esta activación todavía se mantenía a los 28 dpi (luego del 1^{er} desafío), y fue superior a la que mostraron las células de los animales no vacunados infectados y no infectados (no se muestra).

La infección experimental no indujo abortos en ninguno de los animales desafiados. Algunas vaquillonas presentaron lesiones macroscópicas de placenta, como

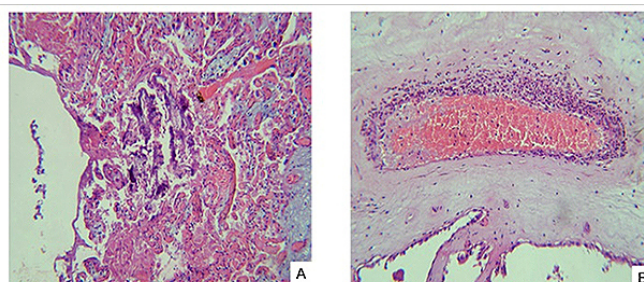


Figura 11. Análisis histopatológico en muestras de placenta. Se muestran ejemplos de lesiones tisulares compatibles con neosporosis detectadas en el animal número 6, que presentó calcificación focal (A) y cuffing perivascular (B).

autólisis severa o edema (Tabla 3). Uno de los animales no vacunados desafiado a los 78 dg con signos de edema en la placenta parió un ternero con bajo (14 kg). También se detectaron mediante un análisis histopatológico lesiones tisulares variables en placenta (placentitis leve con cuffing perivascular, placentitis moderada con cuffing perivascular y focos de infiltrados linfocitarios). Uno de los animales no inmunizados mostró lesiones severas, que incluían signos de necrosis (Tabla 3, Fig. 11).

Se analizaron diferentes porciones de placenta de los animales infectados en busca de la presencia de ADN del parásito por PCR anidada (tabla 13). Como control negativo se usaron pociones de placenta de un animal no infectado ni inmunizado (no se muestra). Sólo la placenta de uno de los animales vacunados e infectados en el

1^{er} desafío resultó positiva por PCR (1/4). Se pudo tomar muestra de 4 de los 5 animales vacunados e infectados en el 1^{er} desafío, entre los cuales no se pudo detectar la presencia del parásito. Por el contrario, todas las placentas de los animales no vacunados e infectados en el 2^{do} desafío fueron positivas por PCR (3/3), mientras que solo una de las placentas de los animales inmunizados y desafiados es esta instancia fue positiva (1/3) (Tabla 3).

Un resultado negativo por PCR en muestras de placenta no constituye un diagnóstico certero de ausencia de infección ya que se analiza una pequeña porción de esta. Por eso, y a pesar de que analizamos dos porciones distintas seleccionadas al azar de cada muestra de placenta, se analizaron otros parámetros para incrementar la sensibilidad del diagnóstico. Evaluamos muestras de

Tabla 3. Ensayo en paralelo para determinar protección contra la transmisión congénita contra el parásito luego del desafío a los 78 dg (1^{er} desafío) ó 212 dg (2^{do} desafío). Se indican las muestras analizadas y resultados. La ingesta de calostro se verificó en suero de los terneros por LPBE contra VFA cepa O1/ Campos, y midiendo la actividad de la enzima GGT en unidades internacionales (IU) por L. Se indican en celeste los animales que calostraron. Las muestras de suero de terneros privados de calostro se analizaron por ELISA empleando un kit comercial para detectar anticuerpos anti *N. caninum* y por PCR anidada en muestras de placenta. Se estableció el ranking de daño histológico ^a Ternero con bajo peso al nacer (14 kg) y edema en placenta. ^b Placenta retenida con autólisis severa. ^c Edema en placenta. DUD: dudoso. ND: No determinado.

Datos de las vaquillonas			Control de la ingesta de calostro		Placenta		Serología <i>N.caninum</i>
Animal nro.	Vacuna	Desafío	Títulos LPBE (VFA)	GGT (IU/L)	PCR anidada	RankingHistol.	Resultado
4	No	1 ^{ero}	1.1	46	NEG	0	POS
10	No	1 ^{ero}	1.1	46	POS	1	POS
12	No	1 ^{ero}	1.12	46	POS	2 ^a	POS
6	No	1 ^{ero}	2.42	ND	POS	3	-
2	No	1 ^{ero}	3.6	220	ND	ND	POS
17	Sí	1 ^{ero}	1.1	35	NEG	1	DUD
1	Sí	1 ^{ero}	1.17	46	NEG	2	DUD
11	Sí	1 ^{ero}	1.1	46	NEG	ND	NEG
19	Sí	1 ^{ero}	1.1	46	NEG	2	POS
15	Sí	1 ^{ero}	3.6	665	ND	ND	-
14	No	2 ^{do}	1.13	35	POS	2	POS
18	No	2 ^{do}	3.6	1092	POS	2 ^b	-
16	No	2 ^{do}	ND	35	POS	2	POS
7	Sí	2 ^{do}	1.1	35	NEG	2	NEG
13	Sí	2 ^{do}	1.17	35	NEG	1	DUD
3	Sí	2 ^{do}	1.2	46	ND	ND	DUD
5	Sí	2 ^{do}	2.01	46	NEG	2	-
9	Sí	2 ^{do}	3.6	104	ND	ND	-

suero de los terneros en busca de anticuerpos pre-calostales anti *N. caninum*.

La ausencia de anticuerpos maternos circulantes se verificó midiendo anticuerpos específicos contra el virus de la fiebre aftosa (VFA) utilizando un ensayo de ELISA en fase líquida (Maradei, La Torre et al. 2008), ya que todas las vaquillonas habían recibido al menos 4 inmunizaciones y presentaban altos niveles de anticuerpos anti-VFA, que se transfieren al ternero exclusivamente a través de calostro (Bucafusco, et al. 2014). También se realizó una determinación bioquímica en la que se detectó la actividad de la enzima gamma glutamil-transferasa (GGT) en suero, ya que esta enzima se transfiere únicamente por calostro (Braun et al. 1982). Se pudieron obtener muestras de suero de 12 de los 18 terneros recién nacidos antes de la ingesta de calostro (Tabla 3, los animales que calostraron se resaltan en celeste). En general, los niveles de anticuerpos anti *N. caninum* fue menor en los terneros nacidos de madres inmunizadas, respecto a los nacidos de animales no inmunizado (tabla 3).

A pesar del bajo número de animales que dificulta realizar una adecuada evaluación estadística, los resultados obtenidos sugieren que existiría cierto grado de protección a la infección congénita. No fue posible establecer si la vacuna puede proteger contra el aborto ya que el grupo no vacunado no abortó y no es posible establecer parámetros indirectos.

DISCUSIÓN

En una primera etapa, seleccionamos el antígeno más apropiado entre diversas posibilidades de antígenos de fácil obtención: taquizoítos inactivados o extractos proteicos de ellos. Los antígenos fueron evaluados en función de su capacidad de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células dendríticas (DCs), favoreciendo la presentación antigénica, la iniciación de la respuesta adquirida y posiblemente también la respuesta celular favorecida por el entorno de citoquinas (Kaisho 2012). Este antígeno es de fácil producción a bajo costo.

Evaluamos el efecto modulador de distintos adyuvantes en ratones vacunados. Determinamos que la producción de IFN- γ está asociada a la masa antigénica y al adyuvante empleado en la formulación. La correlación entre la masa antigénica y los niveles de IFN- γ ya había sido descrita previamente en vacunas contra la fiebre aftosa (Parida et al. 2006). La cantidad de antígeno empleada en las formulaciones de este trabajo (4 y 0.4 μ g) es mucho más baja que las que se ha reportado. Ribei-

ro y col. (2009) demostraron la capacidad protectora de sNcAg combinado con ODN CpG en ratones luego de 3 dosis conteniendo 25 μ g de proteína cada una de ellas. Otros autores reportaron la inmunogenicidad de una vacuna formulada con 10 μ g de sNcAg (Miller et al. 2005, Ellis et al. 2008).

Las vacunas formuladas con dosis altas de sNcAg e ISCOM o AVEC incrementaron los niveles séricos de IgG2a y la producción IFN- γ por parte de las células T. La facultad del ISCOM de inducir una respuesta balanceada Th1/Th2 ya había sido descrita previamente (Morein et al. 2004). La capacidad adyuvante de AVEC podría deberse a la habilidad de los fosfolípidos de la lecitina de formar nanopartículas que faciliten la captura del antígeno, permitiendo así disminuir la dosis del mismo (Sloat et al. 2010), por otro lado los dominios hidrofóbicos se combinan con las saponinas atrapando al antígeno a formulación con una dosis baja de sNcAg y -AVEC[®] no indujo la producción de IFN- γ luego de la vacunación, pero primó una respuesta anamnésica que se expandió luego de la infección, limitando la dispersión del parásito en el cerebro. Este adyuvante, además, posee Beta-glucanos que activan TLR2 y CLRs (Albeituni 2013).

Todos los animales vacunados fueron capaces de controlar la infección en su fase aguda; sin embargo, sólo los animales inmunizados con dosis alta de antígeno+ISCOM o bien AVEC con 4 ó 0,4 μ g de sNcAg, fueron resistentes a la fase crónica de la infección. La protección se observó en todos los animales. Estas tres formulaciones promovieron la resistencia al parásito mediante la inducción de elevados niveles de IgG2a de alta avidéz y una respuesta celular con un perfil Th1.

El análisis de la cinética de los anticuerpos en bovinos vacunados con 50 y 100 μ g de sNcAg formulado con -AVEC[®] mostró que el título de anticuerpos específicos se mantuvo superior al de los animales controles por más de dos meses luego de la segunda dosis. El isotipo mayormente inducido fue IgG1. No está del todo claro el rol de los diferentes isotipos en la respuesta inmune de los bovinos, tampoco se conoce exactamente su relación con la protección contra el aborto. No se ha caracterizado completamente el rol de la IgG1 e IgG2 bovinas (Pastoret P 1998). Sin embargo, el hecho de que la IgG1 sea el principal isotipo presente en mucosas, calostro y leche (Bucafusco et al. 2014) podría indicar un rol diferencial de esta inmunoglobulina en los mecanismos efectores mediados por anticuerpos.

Los niveles de IFN- γ , en cambio, tuvieron un pico a los 50 dpv y decayeron hasta los 140 dpv. En estos animales

hubo un gran porcentaje de células T CD4+/ IFN- γ + a los 50 dpv y hasta los 140 dpv. Esto indica que la administración de dos dosis de vacuna prima a las células T para que desarrollen una respuesta específica ante una reexposición a antígenos del parásito, por ejemplo, durante la infección.

Evidenciamos que la aplicación de la vacuna propuesta es segura durante la preñez, ya que no observamos efectos adversos sistémicos ni en el sitio de inyección. No hubo pérdida de la preñez ni nacimiento de terneros de menor peso. Este es un punto sumamente relevante ya que trabajos previos en los que evaluaron vacunas preparadas con taquizoítos muertos reportaron casos de reabsorción embrionaria asociados a la vacunación (Weston et al. 2012).

La infección experimental con taquizoítos de la cepa Nc1 a los 78 y 212 días de preñez no produjo signos clínicos. No se registraron abortos y todos los terneros nacieron a término y en buenas condiciones de salud, excepto uno que nació con bajo peso y algunas lesiones macroscópicas en la placenta. La dificultad en reproducir la enfermedad puede estar relacionada con las condiciones de cultivo celular, ya que Nc1 es una cepa virulenta que ha sido empleada con éxito en infecciones experimentales en bovinos (Bartley et al. 2012).

La transmisión congénita se evaluó de modo indirecto, cuantificando anticuerpos específicos en terneros privados de calostro por ELISA y analizando por PCR anidada la presencia de ADN del parásito en muestras de placenta. La determinación por PCR puede generar falsos negativos, ya que se realiza un muestreo al azar de pequeñas secciones de tejido. En este sentido, proponemos la aplicación de ensayos en paralelo como un método para incrementar la sensibilidad del diagnóstico. Se necesitan más estudios para comprender la inmunocompetencia de los fetos en las distintas etapas de la preñez. Los mecanismos inmunológicos asociados a la protección contra *N. caninum* también deben ser esclarecidos, particularmente el rol del IFN- γ en el control de la infección. La inducción de IFN- γ es esencial para la protección en el modelo murino (Nishikawa et al. 2001), mientras que como indicamos más arriba su rol ha sido cuestionado recientemente en el modelo bovino (Regidor-Cerrillo et al. 2014). Explorar las condiciones en las que el IFN- γ es secretado sin interferir con la preñez, probablemente mediante la aplicación de un esquema de vacunación capaz de inducir una respuesta de IFN- γ que se mantenga en el tiempo luego del desafío, puede ser una estrategia muy útil a la hora de comprender los

mecanismos protectores en esta etapa.

La vacuna conteniendo sNcAg es prometedora para controlar la neosporosis, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo murino y en bovinos no gestantes. No logramos producir aborto en los grupos control, pero los niveles de anticuerpos pre-calostrales anti-*N. caninum* en todos los terneros nacidos de madres vacunadas fueron menores a los nacidos de madres no vacunadas, lo que implica baja o nula transmisión congénita. Los grupos que fueron vacunados presentaron menos animales que evidencian la presencia de ADN del parásito en la placenta y las lesiones que se hallaron por el análisis histopatológico en algunas de estas muestras presentaron menor grado de severidad. También demostramos que la aplicación de esta vacuna durante el primer trimestre de gestación es segura y no causa efectos nocivos en el feto, como lo hacen otras vacunas que habían sido previamente reportadas, causales de muerte embrionaria (Weston, Heuer et al. 2012).

Desde el punto de vista de la generación de conocimiento cabe destacar que son muy pocos los ensayos de eficacia de vacunas que se han realizado en el modelo bovino de hembras preñadas, y que no se cuenta con un modelo validado y estandarizado en el que se pueda evaluar la protección. El desarrollo de un modelo debidamente caracterizado arrojaría resultados más concluyentes y permitiría, además, comparar resultados entre distintos grupos y diseños experimentales.

En conclusión, la vacuna formulada con extractos solubles de taquizoítos de *N. caninum* formulada con nanopartículas derivadas de lecitina de soja con inmunostimulantes de las células presentadoras de antígeno, generó inmunidad en bovinos siendo segura en hembras preñadas y capaz de disminuir la transmisión congénita del parásito. La vacuna ha sido transferida a una empresa Argentina y está siendo evaluada actualmente a campo ya que su uso podría reducir el impacto de la neosporosis en los sistemas productivos.

Bibliografía

- Albeituni et al. 2013. Anticancer Agents Med Chem. 13(5):689-98.
- Bartley et al. Vet. Res. 2012.
- Bucafusco et al. Vaccine. 2014.
- Davison et al. 1999. Int J Parasitol 29(10): 1683-1689.
- De Marez et al. 1999. Int J Parasitol 29(10): 1647-1657.
- Dubey and Lindsay .1996. Vet Parasitol 67(1-2): 1-59.
- Ellis et al. 2008. Vaccine 26(47): 5989-5996.

- Hall, Reichel et al. 2005. *Vet Parasitol* 128(3-4): 231-241
- Hemphill et al. *Parasitol.* 2016. 143(3), 245-259. doi:10.1017/S0031182015001596
- Innes et al. 2002. *Trends Parasitol* 18(11): 497-504
- Kaisho and Akira 2002. *Biochim Biophys Acta* 1589(1): 1-13.
- Koblansky, et al. 2013. *Immunity* 38(1): 119-130.
- Mansilla et al. *Vaccine.* 2012;30(6):1124-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.007.
- Mansilla et al. *Vet Parasitol.* 2013.197(1-2):13-21. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.04.040.
- Mansilla et al. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;165(1-2):75-80.
- McAllister et al. 1998. *Int J Parasitol* 28(9): 1473-1478.
- Miller et al. 2005. *Int J Parasitol* 35(7): 821-828.
- Monney and Hemphill. 2014. *Exp Parasitol.* 140:52-70.
- Morein, Hu et al. 2004. *Adv Drug Deliv Rev* 56(10): 1367-1382.
- Nishikawa et al. 2001. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(4): 811-816.
- Paré, Thurmond et al. 1996. *Can J Vet Res* 60(2): 133-139.
- Parida et al. 2006. *Vaccine* 24(7): 964-969.
- Pastoret 1998. *Handbook of Vertebrate Immunology.* London, UK, Academic Press.
- Regidor-Cerrillo et al. 2014. *Vet Res* 45: 10.
- Ribeiro, Freitas et al. 2009. *Vaccine* 27(19): 2570-2579.
- Sharman PA, Smith NC, et al. 2010. *Parasite Immunol.*;32(8):590-8. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01209.x. PMID: 20626814.
- Schettters TP, Moubri K, Cooke BM. 2009. *J S Afr Vet Assoc.* 2009 Jun;80(2):75-8. doi: 10.4102/jsava.v80i2.174. PMID: 19831266.
- Sloat BR, Sandoval MA, Hau AM, He Y, Cui Z. 2010. *J Control Release.*141(1):93-100. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.08.023
- Weston JF, Heuer C, Parkinson TJ, Williamson NB. 2012. *N Z Vet J.* Jan;60(1):27-34. doi: 10.1080/00480169.2011.631171.