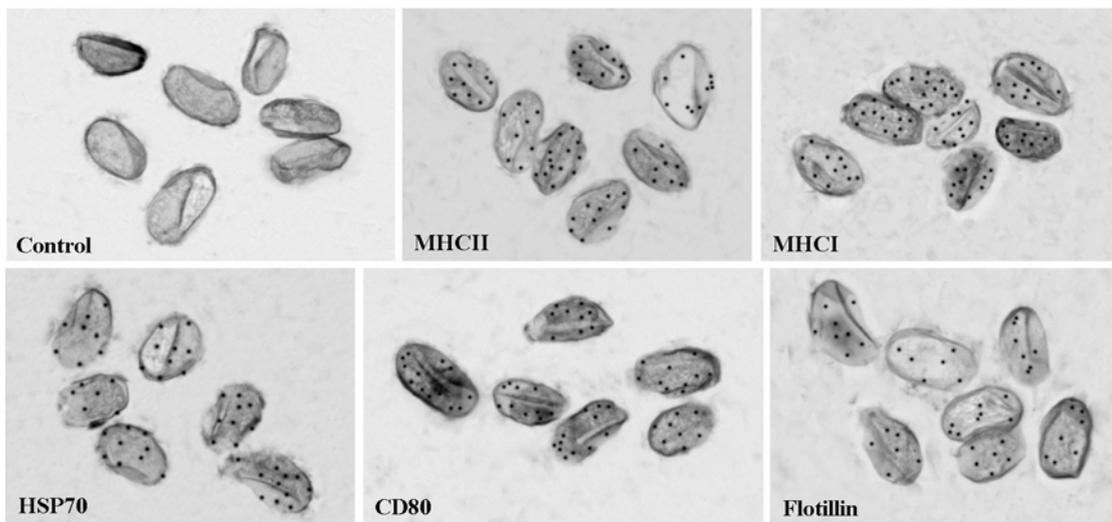


**Inducción de inmunidad frente a infección
por *Eimeria tenella*, *Eimeria máxima* y
Eimeria acervulina utilizando exosomas
derivados de células dendríticas**



Trabajo de Investigación presentado al premio

Enrique Coris Gruart

Modalidad de Sanidad Animal

Convocatoria 2012

INDICE

1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	4
4. Primera prueba clínica	8
4.1. Aislamiento de células dendríticas (CDs).....	8
4.2. Purificación de Ags de <i>E. tenella</i> y enriquecimiento de CDs.....	9
4.3. Obtención y purificación de exosomas derivados de CDs.....	10
4.4. Inmunización e infección experimental.....	11
4.5. Cuantificación de la protección que confieren las CDs o sus exosomas.....	13
4.6. Discusión.....	17
5. Segunda prueba clínica	20
5.1. Obtención y purificación de exosomas portadores de Ags de <i>E. tenella</i> , <i>E. acervulina</i> y <i>E. máxima</i>	21
5.2. Inmunización e infección experimental.....	21
5.3. Cuantificación de la protección que confieren los exosomas.....	23
5.4. Efecto de la inmunización sobre la inmunidad frente a infección simultánea por <i>E. tenella</i> , <i>E. acervulina</i> y <i>E. máxima</i>	28
5.5. Discusión.....	29
6. Bibliografía	32

1. Resumen

Para el control de la coccidiosis aviar son necesarios métodos alternativos a la medicación profiláctica y a la vacunación con parásito vivo debido a las restricciones de la Comunidad Europea en la utilización comercial de los coccidiostáticos, a la aparición de cepas resistentes y al alto coste que supone el desarrollo de nuevos fármacos.

En el presente estudio, describimos una estrategia alternativa de vacunación contra la infección por *Eimeria* utilizando células dendríticas (CDs) enriquecidas con antígenos del parásito o los exosomas que liberan. Se aislaron CDs del intestino de pollos infectados con *Eimeria tenella* y se enriquecieron con un extracto de esporozoítos del parásito como antígeno. Se incubaron las CDs en las condiciones idóneas para la liberación de exosomas, que se aislaron y purificaron. Se desarrolló un primer ensayo clínico para determinar si eran las CDs o sus exosomas los más eficaces en proporcionar inmunidad frente a una infección por *E. tenella*. Para ello se inmunizaron pollos, con CDs o con sus exosomas, que posteriormente se infectaron con el parásito. La inmunización con CDs o exosomas determinó una sólida protección frente a *E. tenella* inducida por la polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta Th1 (incremento de IL-2, IL-16, IFN- γ , IgA e IgG). La capacidad de multiplicación del parásito fue significativamente menor en animales inmunizados con exosomas que en aquellos inmunizados con CDs. Es decir, la inmunización con exosomas resultó ser más eficaz que la inmunización con CDs. En un segundo ensayo clínico se diseñó una estrategia de inmunización exclusivamente con exosomas, pero

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

en este caso, liberados por CDs enriquecidas con antígenos de 3 especies de *Eimeria*, *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*, que son las especies encontradas más frecuentemente en los brotes de coccidiosis que afectan al pollo de carne.

Los animales inmunizados con estos exosomas se infectaron con las 3 especies de *Eimeria* y se pudo comprobar que la inmunización con exosomas determinó un estado de protección muy eficaz frente a la infección por las tres especies. La inmunización con exosomas determinó un incremento de la respuesta Th1 a la vez que una disminución de la respuesta Th2 (IL4 e IL10). La capacidad de los exosomas para inducir un estado de protección frente a diversas especies de *Eimeria* sugiere que es posible desarrollar una vacuna polivalente, constituida por exosomas, frente a todas las especies de *Eimeria* que desencadenan la coccidiosis aviar.

2. Summary

Current methods for sustainable control of avian coccidiosis, whether by prophylactic medication or parasite vaccination, are suboptimal. In this study, we describe an alternative immunization strategy against *Eimeria tenella* infection using parasite antigen (Ag)-loaded dendritic cells (DCs), or their derived exosomes, in the absence of free Ag. Intestinal DCs were isolated from *E. tenella*-infected chickens and loaded ex vivo with an extract of sporozoites as parasite Ag. Extracellular vesicles purified from the Ag-pulsed DCs were identified as exosomes. Both DCs and their derived exosomes were used in a first trial to immunize chickens before infection with the parasite in order to determine which one is more efficient in induction of protective

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

immunity against avian coccidiosis. Immunized chickens exhibited (a) higher numbers of caecal tonsil and spleen cells expressing IgG and/or IgA antibodies that were reactive with *E. tenella* Ag, (b) greater numbers of cells producing Th1 cytokines, and (c) higher *E. tenella* Ag-driven cell proliferation, compared with chickens immunized with Ag in the absence of DCs or exosomes. In addition, chickens immunized with exosomes displayed a higher reduction in fecal oocyst shedding compared with those immunized with DCs. These findings demonstrated that a higher T cell-dependent protective immune response against *E. tenella* infection was generated by in vivo administration of exosomes than that induced by immunization with DCs. In a second trial, a novel immunization strategy against avian coccidiosis was designed using exosomes loaded with a mixture of sporozoite extracted antigens from *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*, the three major coccidial species that are responsible for the majority of avian coccidiosis in commercial production facilities. Chicken intestinal DCs were isolated and pulsed in vitro with the antigens and the cell-derived exosomes were isolated. Chickens were nonimmunized or immunized intramuscularly with exosomes and subsequently noninfected or coinfecting with *E. tenella*, *E. maxima*, and *E. acervulina* oocysts. Immune parameters were the numbers of cells secreting Th1 cytokines, Th2 cytokines, interleukin-16 (IL-16), and Ag-reactive antibodies in vitro and in vivo readouts of protective immunity against *Eimeria* infection. Cecal tonsils, Peyer's patches, and spleens of immunized and infected chickens had increased numbers of cells secreting the IL-16 and the Th1 cytokines, greater Ag-stimulated proliferative responses, and higher numbers of Ag-reactive IgG and IgA-producing cells. In

contrast, the numbers of cells secreting the Th2 cytokines IL-4 and IL-10 were diminished in immunized and infected chickens. These results suggest that successful field vaccination against avian coccidiosis using exosomes derived from DCs incubated with Ags isolated from *Eimeria* species may be possible.

3. Introducción

La coccidiosis, una enfermedad intestinal de gran importancia económica en aves, es causada por múltiples especies de *Eimeria*. El parásito invade la mucosa intestinal y causa importantes lesiones en el epitelio que desencadenan diarrea, empeoramiento del índice de conversión y pérdida de peso. Los métodos convencionales de control de la enfermedad consisten en la administración de fármacos con actividad coccidiostática. Sin embargo, actualmente son necesarios métodos alternativos debido al incremento de las restricciones de la Comunidad Europea en la utilización comercial de los coccidiostáticos, a la aparición de cepas resistentes y al alto coste que supone el desarrollo de nuevas fármacos.

La vacunación con parásito vivo atenuado es una alternativa a los coccidiostáticos como método para controlar la enfermedad. Sin embargo, con las vacunas disponibles en el mercado, la vacunación está limitada por la falta de protección cruzada frente a las especies de *Eimeria* y por la aparición constante de nuevas variaciones antigénicas. A pesar de todas estas limitaciones, la vacunación es el método más eficaz para prevenir la enfermedad y reducir las pérdidas económicas. En la presente investigación nos proponemos iniciar el camino hacia la consecución de una vacuna

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

eficaz frente a la coccidiosis aviar que ofrezca protección cruzada frente a múltiples especies de *Eimeria*

El desarrollo de una segunda generación de vacunas que ofrezca protección cruzada frente a las múltiples especies de *Eimeria* requiere el conocimiento de la respuesta inmune en el intestino de las aves, desde las fases iniciales de presentación de antígeno (Ag) hasta el establecimiento de inmunidad humoral y celular específicas frente al parásito. Como parte de este proyecto, recientemente hemos puesto a punto la técnica de aislamiento de las células dendríticas (CDs), implicadas en la respuesta inmune frente a *Eimeria*, a partir del intestino de pollos experimentalmente infectados con *E. tenella*. La utilización de las CDs como adyuvantes de Ag del parásito podría ser una estrategia alternativa a los fármacos y a las vacunas actuales.

Las CDs son células presentadoras de Ag críticas para la inducción de inmunidad frente a todo tipo de agentes patógenos. En la actualidad, protocolos vacunales basados en CDs están siendo objeto de experimentación en mamíferos con el objetivo de incrementar la respuesta inmunitaria que se produce frente a virus, bacterias, parásitos y hongos (Bozza et al., 2004; Carrión et al., 2008; López et al., 2000; Lu and Zhong, 1999).

Las estrategias de vacunación basadas en CDs tienen como base la técnica que consiste en enriquecerlas *in vitro* con Ags derivados de los patógenos. Uno de los mecanismos propuestos a través de los que las CDs desencadenan una respuesta inmunitaria, ya sea celular o humoral, es la secreción de exosomas (Colino and Snapper, 2006). Se ha sugerido que los exosomas liberados por células presentadoras

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

de Ag (CPA) desempeñan un importante papel en la respuesta inmunitaria adaptada frente a virus, bacterias, hongos y parásitos (López et al., 2000; Bozza et al., 2004). De hecho, publicaciones recientes parecen confirmar el papel de los exosomas como vía de inmunización frente a infecciones por *Toxoplasma gondii* (Beauvillain et al., 2007), *Leishmania major* (Schnitzer et al., 2010), *Mycobacterium tuberculosis* (Bhatnagar et al., 2007), and *Salmonella typhimurium* (Bhatnagar et al., 2007). Los patógenos intracelulares son captados por las CPA y procesados en péptidos antigénicos que se unen a CMH-II en el interior de endosomas. Los complejos cargados de Ag son liberados a la superficie de la célula mediante fusión del endosoma con la membrana celular o son liberados extracelularmente como exosomas intactos (Murk et al., 2002). De esta forma, los complejos Ag-CMH-II son presentados a células T bien sobre la superficie de la CPA o a través de sus exosomas. Es importante destacar que la barrera del CMH no restringe la eficacia de los exosomas ya que los exosomas singénicos no parecen funcionar significativamente mejor que los alogénicos (Beauvillain et al., 2007; del Cacho et al., 2011). Dada la capacidad de las CDs y exosomas para estimular células T, diversos autores han propuesto que podrían ser excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas frente a algunos agentes patógenos de mamíferos (Theyry et al., 2002; Colino and Snapper, 2006; Denzer et al., 2000). Sin embargo no hay información sobre si, de forma similar, CDs enriquecidas con Ag y sus exosomas pueden iniciar una respuesta inmunitaria eficaz en aves. Nuestro equipo ha publicado recientemente un método de aislamiento de CDs de órganos linfoides localizados en la mucosa del intestino de

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

pollo y el protocolo para su posterior enriquecimiento *ex vivo* con Ags de *Eimeria* (del Cacho et al., 2009).

La primera fase del proyecto se dirigió a la obtención de exosomas liberados por CDs enriquecidas con Ags aislados de *E. tenella*.

En la segunda fase la atención se centró en el diseño de una estrategia de inmunización utilizando bien CDs enriquecidas con Ag o bien los exosomas liberados por ellas, con la finalidad de evaluar su potencial como vacunas frente a la coccidiosis aviar. Para ello se diseñó una primera prueba clínica en la que se inició la investigación con una estrategia de inmunización frente a una infección experimental con *E. tenella* y en la que, por primera vez, se utilizan CDs enriquecidas con Ag del parásito o los exosomas que liberan. Una vez establecido cual de los dos, CDs o sus exosomas, induce una inmunidad más eficaz para prevenir la infección por *Eimeria*, abordamos una segunda prueba clínica para evaluar si el enriquecimiento con Ags de 3 especies de *Eimeria*, *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina*, genera inmunidad que proteja frente a la infección simultánea por las 3 especies. Se han seleccionado estas 3 especies de *Eimeria* porque una vacuna contra la coccidiosis debe inducir protección frente a especies de *Eimeria* con importancia económica y es bien sabido que estas tres son las más patógenas para el pollo de carne (Chapman et al., 2005).

4. Primera prueba clínica

En la primera prueba clínica los pollos fueron inmunizados con CDs enriquecidas con Ags de *E. tenella* o con sus exosomas y 10 días más tarde se infectaron con *E. tenella* para determinar cual de las dos pautas de inmunización era más eficaz en prevenir la enfermedad. Para cuantificar el estado de protección frente al parásito se utilizaron los siguientes parámetros: número de células activadas por el Ag que producen citoquinas implicadas en la respuesta inmune celular (IL-2, IL-16, INF- γ), IgA e IgG, ganancia de peso de los animales, índice de conversión, excreción de ooquistes, lesiones en el intestino y tasa de mortalidad.

4.1. Aislamiento de CDs

Las CDs se aislaron según la técnica puesta a punto por nuestro equipo (del Cacho et al., 2009), mediante citometría de flujo que es una técnica que no daña las membranas celulares (Sorensen et al.,1999). Pollos de 3 semanas de vida se infectaron mediante la administración experimental de 10.000 ooquistes esporulados de *E. tenella*, a los 8 días post infección se sacrificaron los animales y se recogieron las tonsilas cecales. Las CDs se disgregaron mediante el efecto de soluciones enzimáticas de acuerdo con la técnica propuesta por del Cacho et al. (2008). Las células separadas se incubaron en el anticuerpo policlonal, fabricado en nuestro laboratorio y que identifica CDs de aves (del Cacho et al., 2008), durante 30 minutos a una dilución de 1:100. Posteriormente se incubaron en anti-IgG de conejo marcado con fluoresceína. Las células se pasaron a través de un citómetro de flujo EPICS ELITE (Coulter electronics). Se establecieron los parámetros de expresión de fluorescencia y complejidad celular que definían a las

células marcadas con el anticuerpo policlonal. Se realizó el aislamiento de las CDs, marcadas con fluoresceína, mediante la capacidad de separación celular del citómetro de flujo.

4.2. Purificación de Ags de *E. tenella* y enriquecimiento de CDs

Para la obtención de Ags consideramos que lo más adecuado sería trabajar con esporozoítos. Los esporozoítos son la primera fase infectante del ciclo coccidial de *Eimeria* y si conseguimos bloquear la entrada de los esporozoítos en la célula hospedadora evitaríamos la aparición de lesiones intestinales. Además, los Ags extraídos de esporozoítos han sido utilizados en trabajos anteriores con buenos resultados (Garg et al., 1999; Shirley and Bedrnfk, 1997; Talebi and Mulcahy, 2006). Por tanto, para enriquecer las CDs se utilizaron Ags extraídos de esporozoítos de *E. tenella* según el método descrito por nuestro equipo (del Cacho et al., 2009). El método se centra en la obtención de receptores de superficie del parásito ya que la capacidad infectiva de *E. tenella* depende de receptores de superficie (López-Bernad et al., 1996; del Cacho et al., 1997). Dichos receptores forman parte de estructuras complejas denominadas rafts, compuestas por lípidos y proteínas (Jain et al., 2005; Neel et al., 2005), que son resistentes a la acción de detergentes orgánicos y que se aíslan de membranas celulares como Ags insolubles (Lygren et al., 2005). Por ello, nos propusimos el aislamiento de Ags insolubles de *E. tenella* que son los que contienen los receptores de superficie esenciales para la vida del parásito. Los esporozoítos lisados por sonicación se incubaron en 1% Triton X-100 en Buffer (25mM Tris, 150mM NaCl, 5 mM EDTA) durante 1h a 4°C. Posteriormente se

centrifugaron a 100.000 g durante 1 hora. Se recogió el sedimento que se incubó en Triton X-100 durante 1 hora a 4°C y se centrifugó a 100.00 g durante 1 hora. El aislamiento de los rafts se llevó a cabo mediante centrifugación en solución de sacarosa al 40%, a 950 g durante 25 min. Se recogió el sobrenadante y la cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry et al. (1951). Los Ags extraídos se añadieron en una concentración de 500µg/ml al medio de cultivo en el que se mantenían las CDs ($5,0 \times 10^5$ células). La incubación se prolongó durante 24 h a 39°C.

4.3. Obtención y purificación de exosomas derivados de CDs enriquecidas con Ag

Las CDs enriquecidas se sometieron a stress por calor (43,5°C) durante 30 min y posteriormente a un periodo de recuperación a 41°C (la temperatura basal del pollo) durante 2 horas. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación del sobrenadante de los cultivos y posterior filtrado a través de filtros de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). Los filtrados se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 min, se recogieron los sobrenadantes y los exosomas se obtuvieron por centrifugación a 100.000 g durante 1 hora a 4°C (Beckman ultracentrifuga L80M con un rotor 70,1 Ti). El sedimento se resuspendió en PBS en la proporción 1:100 y se almacenó a -20°C en alícuotas.

La presencia de exosomas se comprobó mediante microscopía electrónica (Fig. 1). Para ello, algunas gotas de sobrenadante se colocaron sobre rejillas cubiertas con colodión y se fijaron con 0,05% glutaraldehído. Se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos a proteínas localizadas en los exosomas tales como CMH I y II, CD80, flotilina o HSP70 a una dilución de 1:10 durante 18 horas, y a continuación se

incubaron en el anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 5 nm de diámetro durante 2 horas. Los exosomas se tiñeron con ácido fosfotungstico (Glick and Scott, 1970) y se examinaron al microscopio electrónico (Jeol, Tokyo, Japón).

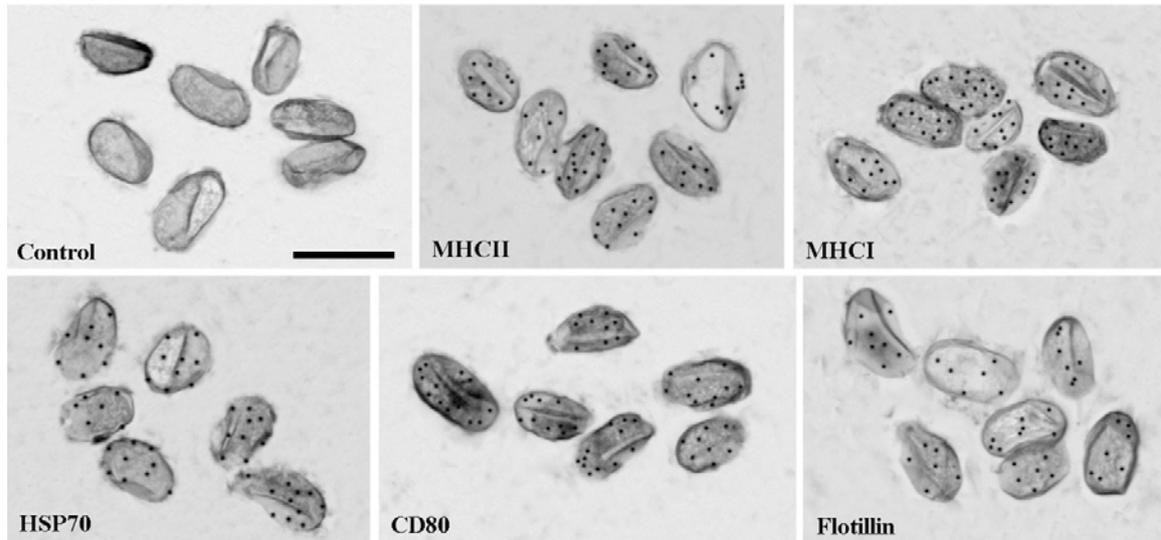


Figura 1. Inmunomicroscopía electrónica de exosomas derivados de CDs enriquecidas con Ags de esporozoítos de *E. tenella*. Las micrografías muestran vesículas de 80-100nm de diámetro marcadas con oro coloidal para poner de manifiesto las proteínas que identifican exosomas.

4.4. Inmunización e infección experimental

El diseño experimental se resume en la Fig. 2. Pollos de un día de edad se distribuyeron en 5 grupos de 50 animales cada uno. A los pollos de los grupos I y II, controles no inmunizados, se les inyectaron intramuscularmente (i.m.) 100 μ l de PBS estéril. Los pollos de los grupos III, IV y V fueron inmunizados, respectivamente, mediante la administración i.m. de 100 μ l de Ag aislado a partir de esporozoítos y utilizado para enriquecer CDs (10 μ g/animal)(Grupo III), 100 μ l de CDs enriquecidas

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

con Ags ($2,0 \times 10^3$ células/ave)(Grupo IV) y 100 μ l de exosomas purificados a partir de CDs enriquecidas con Ags de *E. tenella* (10 μ g/ave)(Grupo V). A los 10 días posinmunización, 10 animales de cada grupo se sacrificaron y se extrajeron las tonsilas cecales y el bazo de todos ellos. El resto de los animales de los grupos II-V se infectaron mediante inoculación al buche con 10.000 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

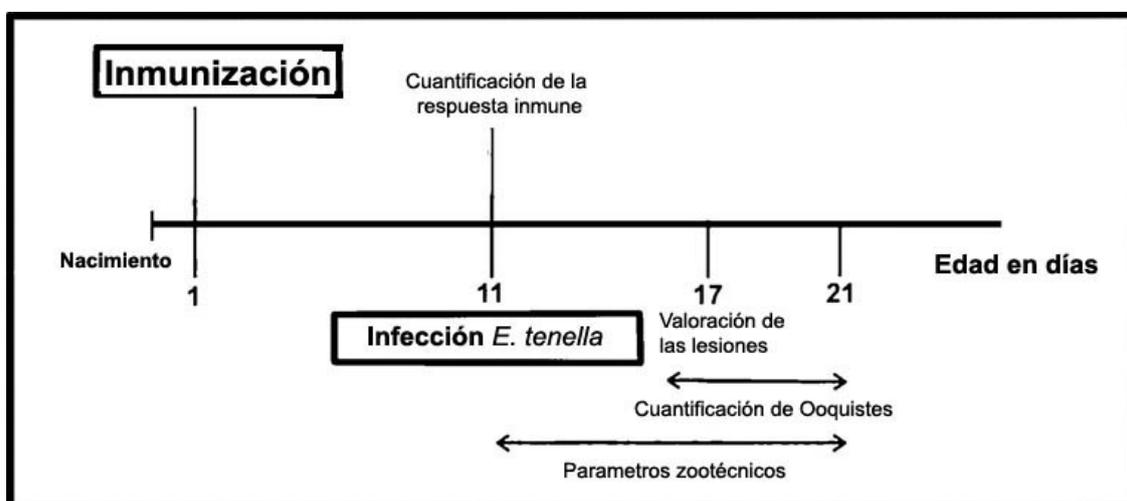


Figura 2. Esquema del diseño experimental. Pollos inmunizados con CDs enriquecidas o con sus exosomas se utilizaron para cuantificar la respuesta celular Th1 que se desencadena y los parámetros zootécnicos.

El peso de los animales y el peso del pienso consumido se cuantificaron los días 0 y 10 posinfección para determinar los índices de conversión. El recuento de ooquistes eliminados en heces se realizó entre los 5 y los 10 días posinfección. A los 6 días posinfección se estudiaron las lesiones que se puntuaron según una escala de 0 (ninguna) a 4 (alta). El porcentaje de mortalidad en todos los grupos se calculó a los 10 días posinfección.

4.5. Cuantificación de la protección que confieren las CDs o sus exosomas

4.5.1. Cuantificación de la respuesta inmune celular.

Se cuantificaron las células que secretan las citoquinas IL-2, IL-16 e IFN- γ . Las tonsilas cecales y el bazo de los animales sacrificados 10 días posinfección se pasaron a través de una malla de 250 μ m, se resuspendieron y se lavaron en solución GKN (Stumbles et al., 1998). La suspensión de células se obtuvo por filtración a través de una malla de 70 μ m (BD Falcon) y se separaron las células muertas, eritrocitos y células epiteliales mediante centrifugación en gradiente de densidad. Como los pollos no eran singénicos, para cuantificar las células estimuladas por los Ags de *Eimeria*, que expresan citoquinas las células de cada pollo ($1,0 \times 10^5$) se cultivaron independientemente con 10 ng/ml LPS en presencia o ausencia de Ags de *E. tenella* (100 μ g/ml) en 0,2 ml del medio de cultivo RPMI 1640 durante 10 días. Las placas se cubrieron con el Ag a 4°C durante toda la noche. Para cuantificar el número de células que expresaban citoquinas se realizó la técnica de Elispot.

4.5.2. Respuesta proliferativa específica de Ag

Células extraídas de las tonsilas cecales y bazo ($1,0 \times 10^5$) se cultivaron en presencia o ausencia de Ags de *E. tenella* (100 μ g/ml) en medio RPMI 1640 durante 3 días. Se añadió BrdU (Boehringer-Mannheim, Germany) al cultivo el día 4 y la proliferación se midió el día 5 utilizando un anticuerpo anti-BrdU unido a peroxidasa. Los controles contenían medio sin Ags de *E. tenella*.

. Resultados de la eficacia de la inmunización sobre la respuesta inmune celular

La inmunización con CDs enriquecidas o con sus exosomas incrementó el número de células que sintetizaban IL-2, IL-16 e IFN- γ en la tonsila cecal y en el bazo ($P < 0,001$) (Fig. 3). De forma paralela, ambas pautas de inmunización determinaron mayor aumento en la proliferación celular en comparación con los animales inmunizados únicamente con Ag ($P < 0,001$) (Fig. 3).

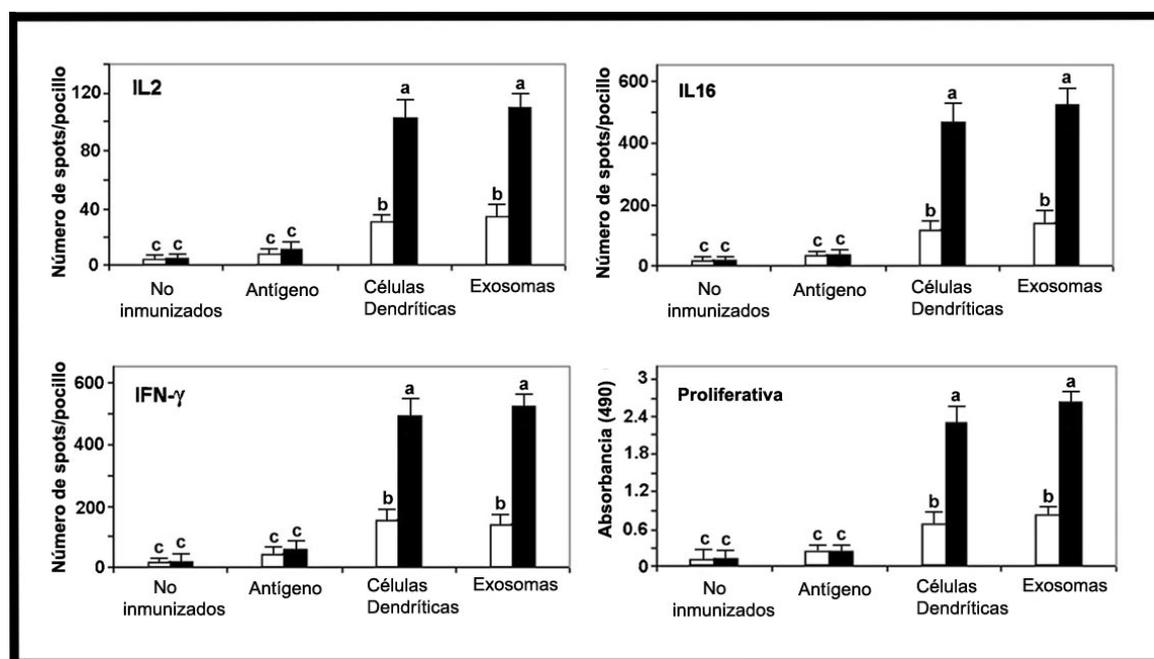


Figura 3. Número de células que secretan citoquinas específicas de Ag y respuesta proliferativa en animales no inmunizados y en pollos inmunizados únicamente con Ag de *E. tenella*, con CDs enriquecidas o con sus exosomas. Las células que sintetizan IL-2, INF-, IL-16 en el bazo (barra blanca) y tonsila cecal (barra negra) se cuantificaron a los 10 días posinmunización mediante ELISPOT. La respuesta de estimulación proliferativa se midió mediante la incorporación de BrdU y se cuantificó mediante ELISA. Cada barra representa el valor medio \pm SD de los resultados de 3 experimentos de inmunización independientes y completos. En cada gráfica, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

Sin embargo, tanto el número de células que producían citoquinas como la proliferación celular fueron mayores en las tonsilas cecales que en el bazo. Las células que se incubaron en ausencia de Ag de *E. tenella* se utilizaron como controles negativos. Así se pudo comprobar que la secreción de citoquinas detectada fue específica de Ag ya que se detectó una escasa cantidad de citoquinas cuando las células se incubaron en ausencia de Ag ($1,3 \pm 0,4$, $5,3 \pm 1,6$ y $7,6 \pm 2,1$ células que sintetizan IL-2, IL-16 e IFN- γ , respectivamente). La cuantificación de células que sintetizan citoquinas y de la proliferación celular en los controles negativos proporcionó cantidades menores que los encontrados en animales no inmunizados ($P < 0,001$).

4.5.3. Cuantificación de la respuesta inmune humoral

La respuesta humoral se cuantificó mediante la técnica de ELISPOT utilizando anticuerpos que reconocen IgG e IgA

. Resultados de la eficacia de la inmunización sobre la respuesta inmune humoral

Células que sintetizan IgG e IgA específicas para Ags de *E. tenella* estaban presentes en la tonsila cecal después de la inmunización con CDs enriquecidas, con sus exosomas o únicamente con Ag (Fig. 4). Los animales inmunizados con CDs o su exosomas mostraron mayor número de células que sintetizaban anticuerpos que los inmunizados únicamente con Ag. Hay que destacar que en las tonsilas cecales no se encontraron diferencias significativas en el número de células que sintetizan IgG e IgA después de la inmunización con CDs enriquecidas o con sus exosomas. Sin

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

embargo, en el bazo únicamente se detectaron células que sintetizan IgG (Fig. 4). El número de células que sintetizan IgG fue mayor en las tonsilas cecales que en el bazo. No se observaron spots cuando las células se incubaron con LPS en ausencia de Ag de *E. tenella*.

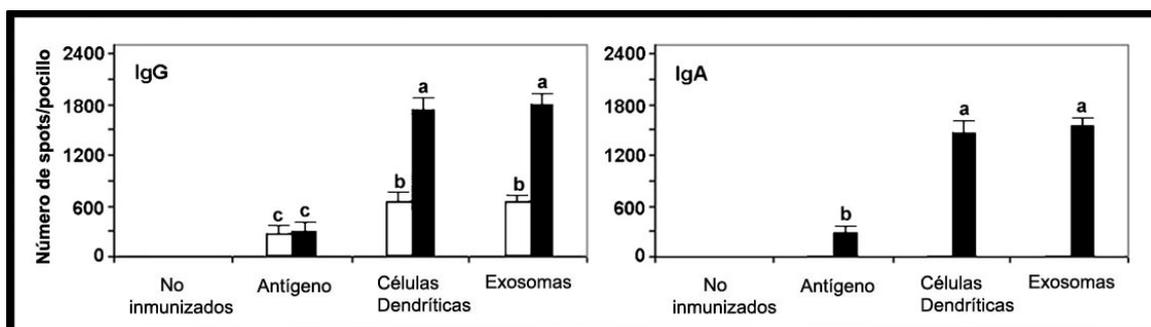


Figura 4. Número de células que sintetizan IgG e IgA anti-Ag de *E. tenella* en pollos no inmunizados e inmunizados con Ag de *E. tenella*, con CDs enriquecidas o con sus exosomas. Las células estimuladas en el bazo (barras blancas) y en la tonsila cecal (barras negras) a los 10 días posinmunización se cuantificaron mediante ELISPOT. Cada barra representa la media \pm SD de los resultados de 3 experimentos de inmunización independientes y completos. En cada gráfica letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

4.5.4. Efecto de la inmunización sobre la infección por *E. tenella*

El efecto de la inmunización sobre la inmunidad frente a la infección por el parásito se cuantificó además mediante parámetros zootécnicos, ganancia de peso e índice de conversión, y parámetros parasitarios, excreción de ooquistes, lesiones intestinales y tasa de mortalidad (Tabla 1). La inmunización con CDs o sus exosomas determinó un incremento de la ganancia de peso y un reducido índice de conversión tras la infección con *E. tenella* en comparación con los animales inmunizados únicamente con Ag e infectados. Hay que destacar que ambos parámetros en animales

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

inmunizados e infectados fueron iguales a los que presentaron los controles no infectados. Las lesiones intestinales y la excreción de ooquistes fueron significativamente menores que las observadas en animales no inmunizados e infectados. Es importante señalar que la excreción de ooquistes fue significativamente menor en los animales inmunizados con exosomas que en aquellos inmunizados con CDs enriquecidas. No se registraron muertes en los animales inmunizados e infectados.

Tabla 1.

Efecto de la inmunización con antígeno, CDs enriquecidas o exosomas sobre la infección por *E. tenella*.

Grupo Experimental	Crecimiento de peso (gr/pollo)	Índice de Conversión (gr pienso/gr peso)	Excreción de Ooquistes ($\times 10^3$ / Pollo)	Cuantificación lesiones (escala 0-4)	Mortalidad (%)
No inmunizado, no infectado	475 \pm 3 ^a	1.52 \pm 0.02 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
No inmunizado, infectado	123 \pm 9 ^b	5.33 \pm 0.05 ^b	5,227 \pm 0.32 ^b	2.8 \pm 0.7 ^b	13.3 \pm 1.4 ^b
Únicamente Antígeno	127 \pm 5 ^b	5.27 \pm 0.04 ^b	5,193 \pm 0.30 ^b	2.8 \pm 0.5 ^b	14.1 \pm 1.4 ^b
Células Dendríticas	472 \pm 5 ^a	1.53 \pm 0.02 ^a	453 \pm 0.28 ^c	0.3 \pm 0.5 ^c	0 ^a
Exosomas	474 \pm 3 ^a	1.52 \pm 0.02 ^a	275 \pm 0.25 ^d	0.3 \pm 0.3 ^c	0 ^a

Cada valor representa la media \pm SD de 3 experimentos de inmunización independientes y completos. En cada grupo los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

4.6. Discusión

La primera prueba experimental demuestra que la inmunización con CDs enriquecidas con Ags de *E. tenella* o con sus exosomas induce una alta protección frente al parásito. La inmunidad inducida se relaciona con la presencia, en el bazo y en la tonsila cecal, de un mayor número de células que producen anticuerpos (IgG e IgA),

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

mayor cantidad de células que sintetizan IL-2, IL-16 y INF- γ y una mayor proliferación celular estimulada por Ags de *E. tenella* que las observadas en animales no inmunizados e infectados o en animales inmunizados únicamente con Ag.

Las vacunas basadas en CDs o sus exosomas se han utilizado en animales que son singénicos con las células del donante, basándose en el dogma de que para que se produzca una respuesta inmunitaria frente a un Ags es necesario el contacto directo de las CDs con linfocitos T portadores de un CMH compatible. Sin embargo, un estudio reciente (Beauvillain et al., 2007) ha demostrado que el hecho de que los animales donantes y receptores no sean singénicos no disminuye la efectividad de la inmunización. De hecho se ha demostrado que la protección inducida mediante la transferencia de CDs enriquecidas con Ag o sus exosomas no depende de la viabilidad celular o de la integridad de las membranas, ya que fragmentos de membrana de las CDs o de sus exosomas son suficientes para desencadenar una respuesta inmune eficaz frente al parásito (Schnitzer et al., 2010). Hay pruebas experimentales que demuestran que para que se llegue a inducir inmunidad por administración de fragmentos de CDs enriquecidas con Ag es necesario que el Ag sea procesado y presentado por CDs del receptor (Schnitzer et al., 2010). Debido a que, en el presente estudio, la base genética de los donantes y receptores era diferente es probable que las CDs transferidas fueron reconocidas como células extrañas y, en consecuencia, destruidas por el receptor. Las CPA del receptor podrían captar y procesar fragmentos de membrana de las CDs transferidas y previamente enriquecidas con Ags de *E. tenella*. De esta forma, las CPA del receptor podrían desencadenar una respuesta inmune eficaz frente al parásito. En mamíferos, se ha demostrado que la inmunización

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

con fragmentos de CDs enriquecidas con Ag o con sus exosomas induce una respuesta Th1, que se caracteriza por un aumento en la secreción de IL-2 e INF- γ que va acompañada por un incremento en la síntesis de IgA e IgG (Schnitzer et al., 2010; De Bie et al., 2002). Estos resultados junto con los hallazgos en la presente investigación sugieren que la respuesta Th1 está probablemente implicada en la respuesta inmune que se desencadena frente al parásito. El aumento de IL-16, que preferentemente atrae células Th1 (Lynch et al., 2003), apoya esta hipótesis.

Un mayor número de células que producen anticuerpos y citoquinas y un aumento en la proliferación celular, dependiente de la activación por Ags de *E. tenella*, se observaron en TCs de pollos inmunizados con CDs o sus exosomas en comparación con las observadas en el bazo. La importancia de este hallazgo radica en el hecho de que las TCs desempeñan un papel primordial en la resistencia frente a la infección por *E. tenella* (Dalloul and Lillehoj, 2006). El hallazgo de una importante respuesta inmune en TC es consistente con los resultados de Aline et al. (2004) que demostraron que un elevado porcentaje de exosomas migran al intestino y a los ganglios linfáticos después de su administración a mamíferos. A diferencia de los mamíferos, las aves no poseen ganglios linfáticos (del Cacho et al., 1993) por lo que es muy probable que, en aves, el procesado inicial del Ag en el intestino se produzca en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, es decir, TCs en el caso de los ciegos, tramo intestinal en el que asienta *E. tenella*.

La aparición de inmunidad inducida fue evidente dado el incremento en la ganancia de peso, la disminución del índice de conversión, la disminución de lesiones

intestinales y la reducida mortalidad en comparación con los animales no inmunizados e infectados. Hay que destacar que la reducción en la excreción de ooquistes fue significativamente mayor en animales inmunizados con exosomas que en aquellos inmunizados con CDs enriquecidas, lo cual indica que se consigue mayor eficacia en la inducción de inmunidad utilizando exosomas en la inmunización previa a la infección.

4. Segunda prueba clínica

Una vez demostrado que la administración de exosomas, derivados de CDs enriquecidas con Ag de *Eimeria tenella*, induce una potente respuesta inmune T-dependiente frente a la infección con el parásito nos planteamos el estudio del potencial de los exosomas como vacuna frente a la coccidiosis aviar. Son varias las especies de *Eimeria* que se encuentran casi siempre presentes en los pollos afectados por coccidiosis (Al-Natoura et al., 2002; Joyner and Norton, 1983; Ogedengbe et al., 2011). Una vacuna debe inducir inmunidad frente a las especies de *Eimeria* más frecuentes en los brotes de coccidiosis, que son, por ello, las de mayor importancia económica (Chapman et al., 2005). En concreto estábamos especialmente interesados en que la vacunación con exosomas proporcionara protección frente a una infección simultánea por *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*, las 3 principales especies responsables de la mayoría de los brotes de coccidiosis aviar en la producción del pollo de carne.

En esta segunda prueba clínica se utilizó como estrategia de inmunización la administración de exosomas derivados de CDs enriquecidas con Ags de las 3 especies de *Eimeria* ya mencionadas. Tras la inmunización los animales fueron coinfectados con ooquistes de las 3 especies para cuantificar la eficacia de la inmunización inducida por los exosomas.

5.1. Obtención y purificación de exosomas portadores de Ags de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*

El aislamiento de CDs, la purificación de Ags de las 3 especies de *Eimeria* y el enriquecimiento de las CDs así como la posterior obtención y purificación de exosomas derivados de las CDs enriquecidas se realizaron siguiendo las mismas pautas y protocolos experimentales detallados en el primer ensayo clínico. Únicamente destacar la siguiente diferencia, los Ags se aislaron y purificaron independientemente a partir de esporozoítos de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima* y una mezcla de Ags que contenía 200 µg de Ags de cada especie (600 µg en total) se incubó con $5,0 \times 10^5$ CDs purificadas para su enriquecimiento.

5.2. Inmunización e infección experimental

El diseño experimental (Fig. 5) fue paralelo al detallado en el primer ensayo clínico. Pollitos de un día de edad se distribuyeron al azar en 3 grupos de 100 pollitos cada uno. Los controles estuvieron constituidos por los animales del grupo I (animales no inmunizados y no infectados) y grupo II (no inmunizados e infectados).

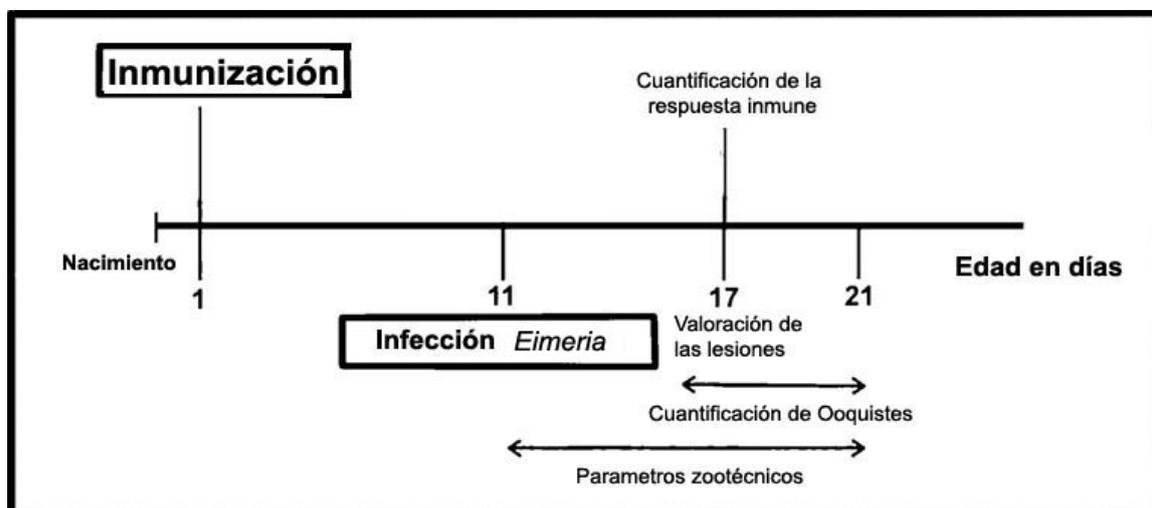


Figura 5. Esquema del diseño experimental

Los animales de los grupos I y II recibieron una inyección de PBS intramuscular, en el músculo pectoral superficial, y a los animales del grupo III se les inyectaron 10 μ l de exosomas (10 μ l/ave). A los 10 días post inmunización, los pollos de los grupos II y III se infectaron con $1,0 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$ y $2,5 \times 10^4$ ooquistes esporulados de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*, respectivamente, por ave mediante inoculación oral directa al buche (Shirley, 1995). El peso y el índice de conversión se cuantificaron los días 0 y 14 posinfección. Se realizaron recuentos del número de ooquistes en heces entre los días 5 y 14 posinfección. A los 6 días posinfección se sacrificaron 20 pollos por grupo para determinar las lesiones intestinales y para cuantificar la respuesta inmune. Siguiendo la misma metodología detallada en el primer ensayo clínico, se cuantificaron las células que secretan citoquinas, IgG e IgA específicas de los Ags, así como la respuesta proliferativa desencadenada.

5.3. Cuantificación de la protección que confieren los exosomas

En la bibliografía se ha demostrado que los exosomas desencadenan una respuesta mediada por células Th1. Al ser la primera vez que se utilizaban exosomas para inmunizar aves nos propusimos comprobar cuál era la respuesta tanto de las células Th1 como Th2 (IL4 y IL10). La cuantificación de las células activadas por los Ags de *Eimeria* que sintetizan citoquinas Th1 y Th2, así como IgG e IgA en la tonsila cecal, PP y bazo se realizó siguiendo las mismas pautas y protocolos experimentales detallados en el primer ensayo clínico. Únicamente destacar las modificaciones derivadas del hecho de que, en esta prueba clínica, se utilizan Ags de tres especies de *Eimeria*.

5.3.1. Resultados de la eficacia de la inmunización sobre la respuesta inmune celular

El mayor número de células que sintetizaban citoquinas Th1 se cuantificó en animales inmunizados. En la TC, PP y bazo de los animales inmunizados con exosomas se observó un incremento en el número de células que sintetizaban IL2, IL16 e IFN- γ (Fig. 6). El mayor número de células que sintetizaban citoquinas Th1 se cuantificó en diferentes localizaciones en función de los antígenos utilizados en la incubación de las células. Cuando las células extraídas a partir de TC, PP o bazo se incubaron con antígenos de *E. tenella* el mayor número de células Th1 se cuantificó en TC (Fig. 6). Sin embargo, cuando las células se incubaron con Ags de *E. maxima* o *E. acervulina* el mayor número de células que sintetizaban citoquinas Th1 se cuantificaron en PP (fig. 6).

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

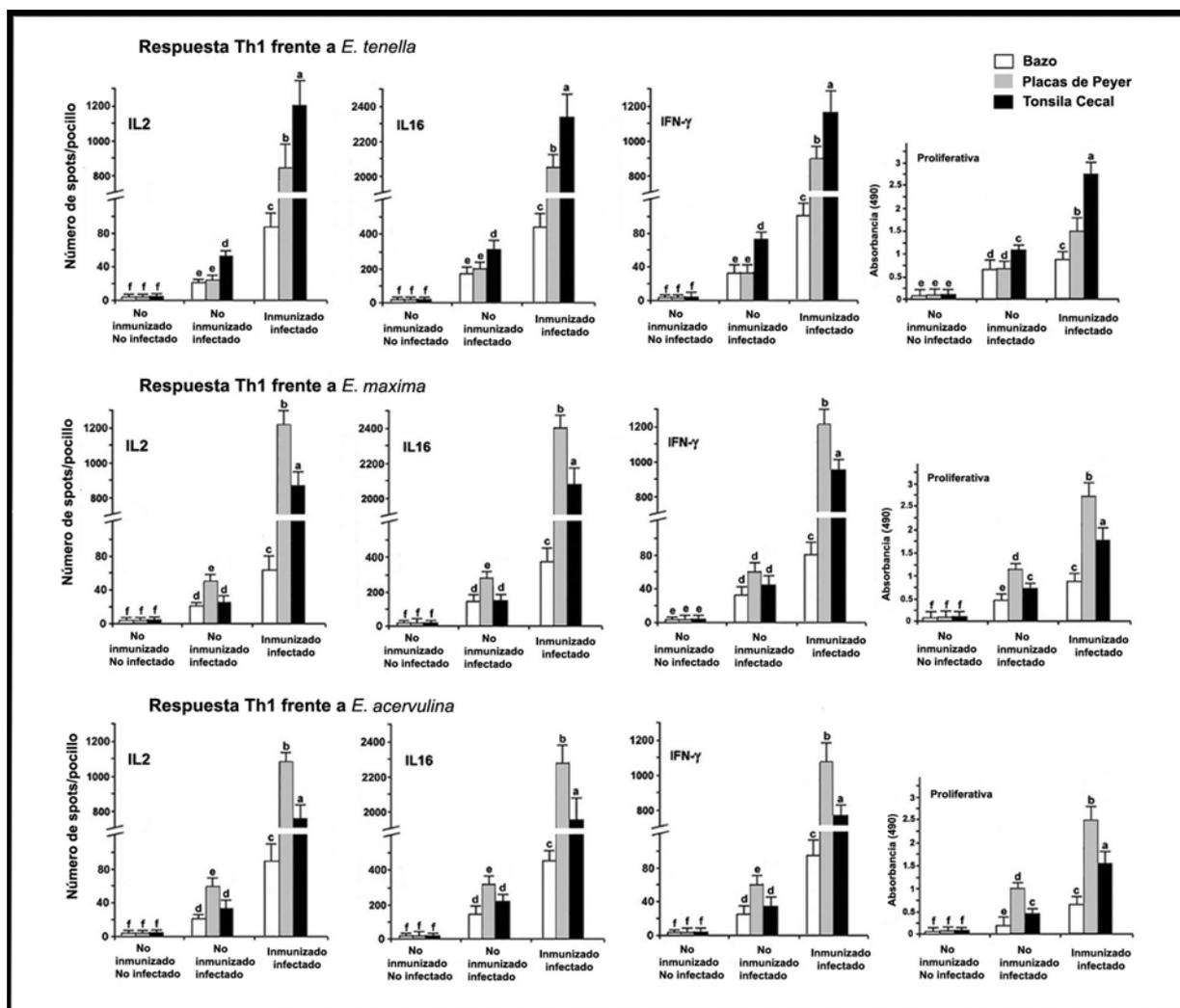


Figura 6. Células que secretan citoquinas Th1 e IL-16 y respuesta proliferativa específicas de Ags de especies de *Eimeria*. Los pollos del grupo I fueron no inmunizado/no infectados, en el grupo II no inmunizados /infectados y en el grupo III inmunizados con exosomas y coinfectados con ooquistes esporulados de *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina*. Células estimuladas por los Ags y que sintetizan IL-2, INF-g e IL-16 en el bazo, tonsila cecal y placas de Peyer fueron cuantificadas a los 6 días posinfección mediante ELISPOT. La respuesta proliferativa estimulada por los Ags se midió mediante la incorporación de BrdU y se cuantificó mediante ELISA. Cada barra representa el valor medio \pm SD de 3 experimentos independientes. En cada gráfica, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

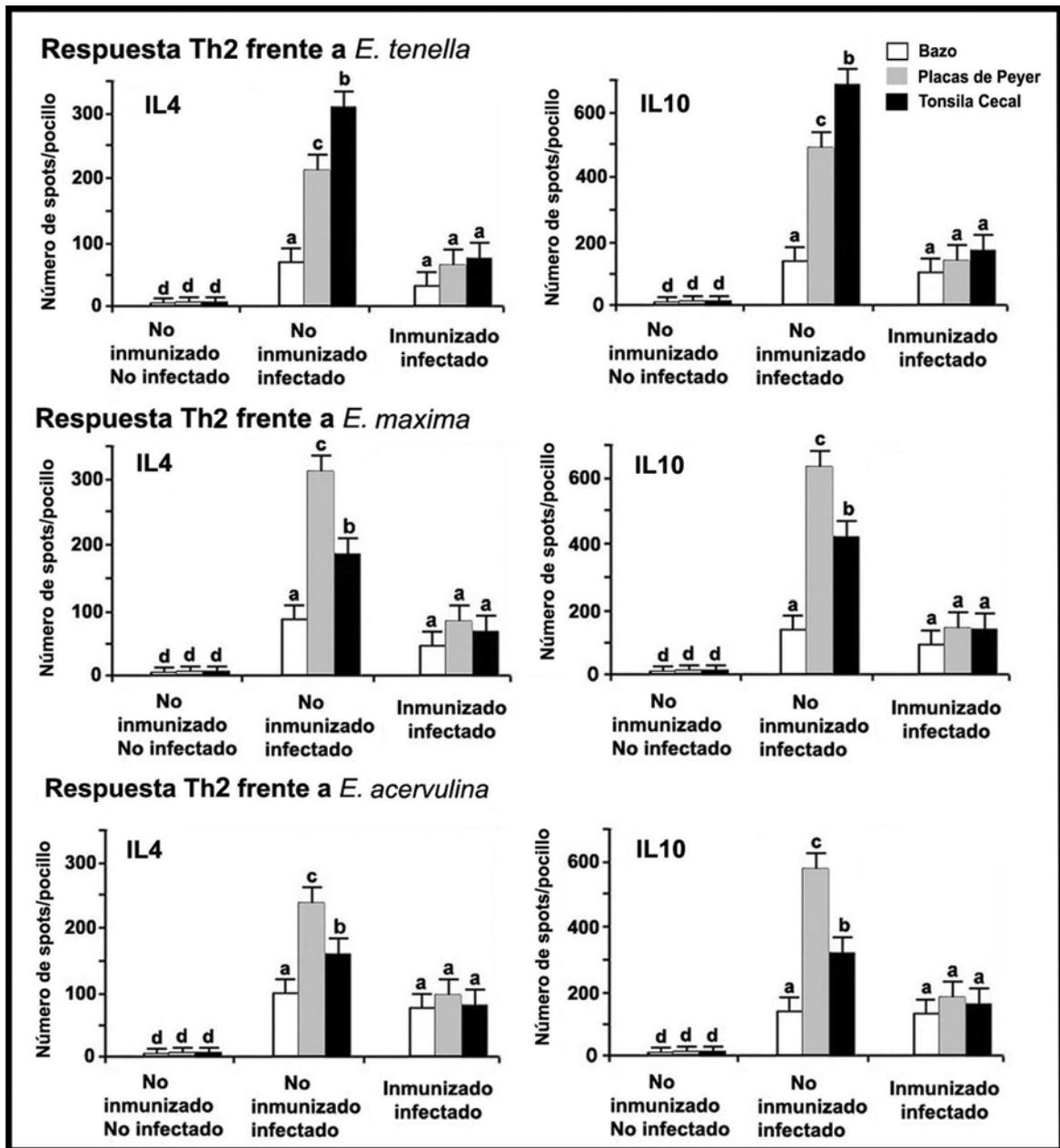


Figura 7. Células, activadas por Ags de especies de *Eimeria*, que secretan citoquinas Th2. Los pollos fueron no inmunizados o inmunizados con exosomas cargados con Ags de 3 especies de *Eimeria* y coinfectados con *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina* o no infectados. Células que sintetizan IL-4 e IL-10 en el bazo, tonsila cecal y placas de Peyer fueron cuantificadas a los 6 días posinfección mediante ELISPOT. Cada barra representa el valor medio + SD de 3 experimentos independientes. En cada gráfica, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

En animales infectados y no inmunizados se cuantificó un incremento muy significativo de células que sintetizaban citoquinas Th2 (Fig. 7). La cinética de expresión de células que sintetizaban citoquinas Th2 fue similar a la descrita para las células Th1. Cuando las células aisladas a partir de TC, PP o bazo se incubaron con Ags de *E. tenella* la mayor expresión de citoquinas Th2 se cuantificó en la TC (Fig. 7). Sin embargo cuando las células se incubaron con Ags de *E. maxima* o *E. acervulina* la mayor expresión de células que sintetizan citoquinas Th2 se cuantificó en PP (Fig. 7).

5.3.2. Resultados de la eficacia de la inmunización sobre la respuesta inmune humoral

La inmunización con exosomas incrementó significativamente en TC, PP y bazo el número de células que sintetizan IgG específica para Ags de las 3 especies de *Eimeria* en comparación con los animales de los grupos control, que incluyen animales no inmunizados con exosomas ($p < 0.005$) (Fig. 8). A su vez, en comparación con los animales de los grupos control, en los animales inmunizados se cuantificó mayor número de células que producen IgA específica para los Ags tanto en TCs como en PPs, pero no en el bazo (Fig. 8). La cinética de las células que sintetizaron IgA e IgG fue similar a la descrita en la respuesta inmune celular para las células que sintetizan IL-16 y citoquinas Th1 (Fig. 6), se observó mayor aumento en el número de células que sintetizan IgG e IgA entre células derivadas de la TC y estimuladas con Ag de *E. tenella* que en células derivadas de PP. Sin embargo, se cuantificó mayor número de células que sintetizan Igs entre células derivadas de PP y estimuladas con Ags de *E. máxima* o *E. acervulina* que entre células aisladas de TC e incubadas con estos mismos Ags (Fig. 8).

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

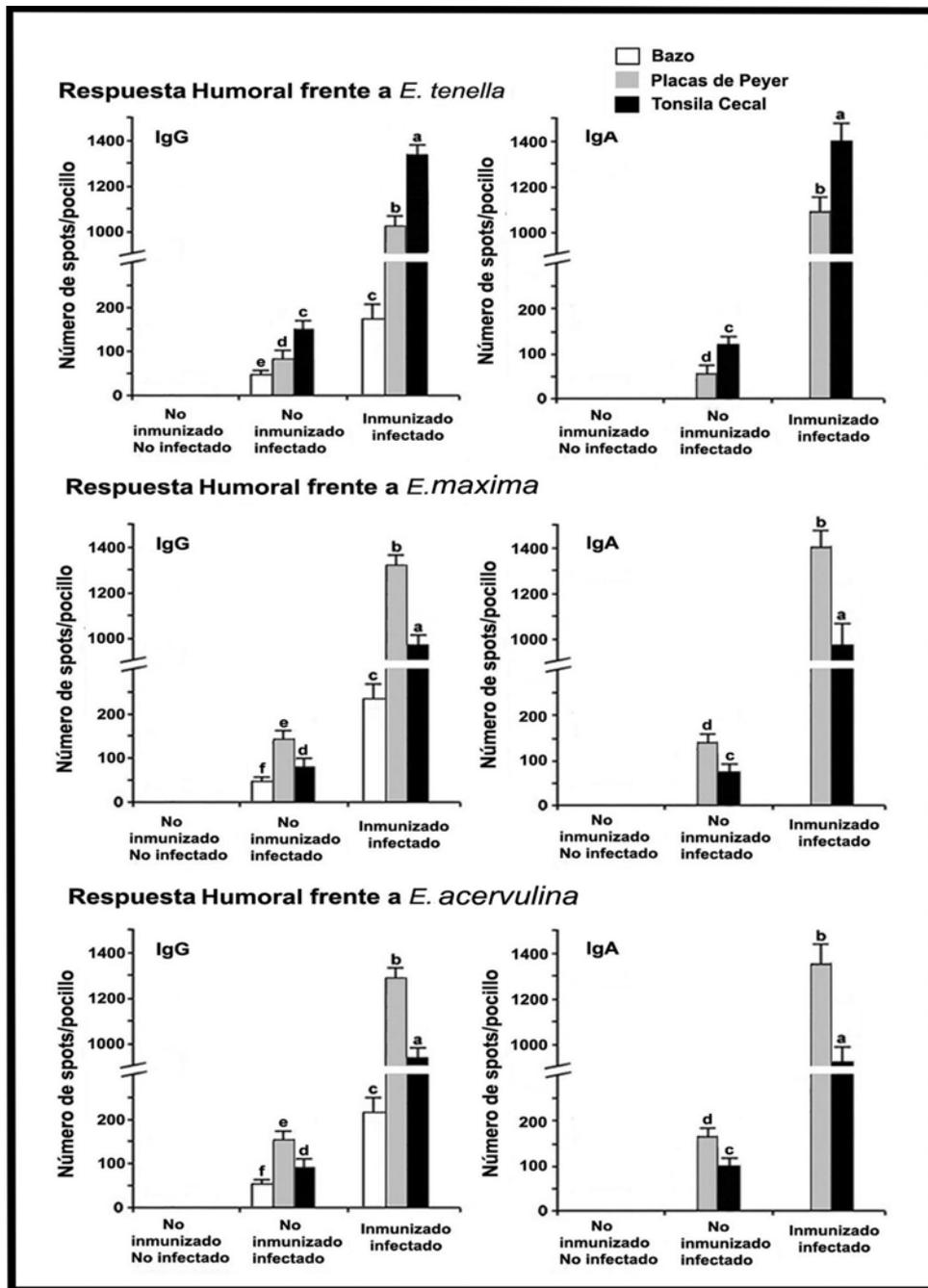


Figura 8. Células que sintetizan IgG e IgA específicas de Ags de *Eimeria*. Los pollos fueron no inmunizados o inmunizados con exosomas y no infectados o coinfectados con *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*. Las células estimuladas por el Ag que secretan Igs en el bazo, tonsila cecal y placas de Peyer a los 6 días posinfección se cuantificaron mediante ELISPOT. Cada barra representa los valores medios \pm SD de tres diferentes experimentos. Dentro de cada gráfica, las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

5.4. Efecto de la inmunización sobre la inmunidad frente a infección simultánea por *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*

Los pollos inmunizados con exosomas experimentaron incremento en la ganancia de peso, disminución en el índice de conversión, disminución en la excreción de ooquistes, disminución del grado de las lesiones intestinales y de la tasa de mortalidad en comparación con los animales control no inmunizados e infectados ($p < 0.05$) (Tabla 2). De hecho la ganancia de peso, el índice de conversión y la tasa de mortalidad en animales inmunizados e infectados fue igual a la de los controles no infectados (Tabla 2).

Tabla 2.

Efecto de la inmunización con exosomas sobre los parámetros zootécnicos y parasitológicos en animales infectados con *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*.

Grupo experimental	Crecimiento de peso (gr/pollo)	Índice de Conversión (gr pienso/gr peso)	Valoración de Lesiones		
			Duodeno	Yeyuno	Ciego
No inmunizado, no infectado	670 ± 18 ^a	1.52 ± 0.08 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
No inmunizado, infectado	243 ± 29 ^b	4.95 ± 0.12 ^b	2.8 ± 0.6 ^b	2.7 ± 0.6 ^b	2.6 ± 0.5 ^b
Inmunizado, infectado	634 ± 21 ^a	1.55 ± 0.09 ^a	0.9 ± 0.7 ^c	0.9 ± 0.6 ^c	1.1 ± 0.7 ^c

Grupo experimental	Excreción de Ooquistes (x10 ³ /Pollo)	Valoración de Lesiones		
		Duodeno	Yeyuno	Ciego
No inmunizado, no infectado	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
No inmunizado, infectado	12,853 ± 0.68 ^b	2.8 ± 0.6 ^b	2.7 ± 0.6 ^b	2.6 ± 0.5 ^b
Inmunizado, infectado	593 ± 0.71 ^c	0.9 ± 0.7 ^c	0.9 ± 0.6 ^c	1.1 ± 0.7 ^c

Cada valor representa la media ± SD de 3 experimentos de inmunización independientes y completos. En cada grupo los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test estadístico de Duncan.

5.5. Discusión

La segunda prueba clínica demuestra la eficacia de la inmunización de pollos con exosomas que derivan de CDs enriquecidas con Ags de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima* sobre el incremento *in vitro* de parámetros relacionados con la inmunidad Th1 y sobre la protección que proporciona *in vivo* frente a una infección simultánea por estas tres especies de *Eimeria*. Las TCs, PPs y bazo de animales inmunizados e infectados tenían mayor número de células que sintetizan IL-16, IL-2 e INF- γ , una mayor respuesta proliferativa estimulada por los Ags de *Eimeria* y un mayor número de células que secretan IgG e IgA específicas para los Ags en comparación con los animales control, no inmunizados/no infectados y no inmunizados/infectados. Sin embargo, las células que sintetizan IL-4 e IL-10 disminuyeron en los animales inmunizados e infectados en comparación con los grupos control. Los animales inmunizados con exosomas e infectados *in vivo* con ooquistes de *Eimeria* incrementaron también su resistencia frente a la coccidiosis en comparación con los controles no inmunizados e infectados como queda patente por el aumento de ganancia en peso, la disminución del índice de conversión, la disminución en la excreción de ooquistes, la disminución de las lesiones intestinales y de la tasa de mortalidad. El presente estudio demuestra, por primera vez, la inducción de inmunidad efectiva frente a una infección experimental simultánea con *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima* utilizando exosomas liberados por CDs enriquecidos con Ags aislados de estas especies de coccidios.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

El aumento de células que producen IL-16, IL-2 y INF- γ en animales inmunizados e infectados en comparación con animales no inmunizados e infectados demuestra que la vacunación con exosomas cargados con Ags de *Eimeria* induce una respuesta Th1. Estos resultados confirman previas observaciones en aves (del Cacho et al., 2011) y mamíferos (Aline et al., 2004; Beauvillain et al., 2007; Schnitzer et al., 2010). Además, la inducción de células que sintetizan y liberan citoquinas Th1 se relaciona con la marcada reducción en el número de células que sintetizan citoquinas Th2 (Bozza et al., 2004; Lu and Zhong, 1999), sugiriendo que la respuesta inmune que se produce tras la inmunización con exosomas cargados con Ags de *Eimeria* está polarizada hacia una respuesta Th1. La IL-16 se seleccionó y se incluyó en el presente estudio para evaluar la eficacia de la inmunización ya que los exosomas estimulan a las células T (Beauvillain et al., 2007; del Cacho et al., 2011; Ehigiator et al., 2007) y la IL-16 tiene dos principales efectos sobre ellas: estimular la migración de células Th1 (Lynch et al., 2003) e inhibir la activación de células Th2 (De Bie et al., 2002). Aunque algunos estudios relacionan la respuesta Th2 con el control de algunas infecciones por protozoos (Petry et al., 2010; Remer et al., 2007), otros concluyen que la inmunidad Th1 es más eficaz en conferir protección contra infecciones por parásitos apicomplexa (Beauvillain et al., 2007; Ehigiator et al., 2007; Hong et al., 2006). Dependiendo del patógeno y del hospedador, el balance local entre la producción de citoquinas Th1 y Th2 es crucial para la resolución de la parasitosis. Dado que en el presente estudio se detectó un bajo nivel de células que sintetizan células Th2 en los animales inmunizados e infectados es posible que estas células puedan desempeñar algún papel en la respuesta del hospedador frente a los coccidios.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

Los parásitos que pertenecen al género *Eimeria* no solo muestran especificidad para el hospedador sino que también muestran un tropismo específico para el intestino del pollo, *E. tenella* coloniza los ciegos, *E. máxima* el yeyuno y *E. acervulina* el duodeno.

La inmunidad del hospedador frente a estos parásitos se inicia como respuesta local en la lámina propia de las TCs y PPs. Los presentes resultados demuestran que la vacunación con exosomas induce una respuesta más intensa en las TCs y PPs que en el bazo, lo que se relaciona con el papel que desempeñan estos órganos linfoides en la resistencia a la infección por especies de *Eimeria*. Las aves, a diferencia de los mamíferos, no tienen ganglios linfáticos encapsulados (del Cacho et al., 1993). Por ello, una vez que se produce la infección por el parásito, el procesamiento inicial de los Ags, tiene lugar en el tejido linfoide asociado a las mucosas, las TCs y PPs. En consecuencia, las estrategias para la vacunación contra la coccidiosis aviar se deben basar en la estimulación de los órganos linfoides asociados a la mucosa del intestino. Dado que los exosomas son capaces de migrar a la mucosa intestinal y presentar Ags a las células inmunocompetentes (Aline et al., 2004), parece posible que la administración de exosomas, de forma equivalente, interaccione con los linfocitos T y B en las PPs y TCs para estimular la inmunidad celular y humoral.

La utilización de exosomas en la inmunización de pollos frente a *Eimeria* no puede competir en precio con el uso de coccidiostáticos o de vacunas de parásito vivo. Pero los resultados del presente estudio demuestran que una única inmunización con exosomas derivados de CDs inducen una inmunidad eficaz frente a la infección simultánea por *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima*. La inmunización con exosomas

puede ser una estrategia alternativa a los métodos convencionales de control de la coccidiosis en caso de que la regulación de los coccidiostáticos haga su utilización más restrictiva. Las vacunas consistentes en exosomas conservan todos los aspectos positivos de una vacuna de parásito vivo y, al mismo tiempo, evitan sus riesgos inherentes. Además de activar una respuesta inmune eficaz frente a *Eimeria*, las vacunas con exosomas nunca provocarían infección ya que carecen de parásito vivo. Investigaciones recientes han demostrado que los exosomas constituyen una herramienta útil en el desarrollo de vacunas contra otros patógenos (Aline et al., 2004, 4, Colino and Snapper, 2006; Schnitzer et al., 2010). Por consiguiente, y teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, parece posible el desarrollo de vacunas polivalentes consistentes en exosomas cargados con Ags procedentes de una gran variedad de patógenos, tales como virus, bacterias y, como se demuestra en la presente investigación, parásitos.

6. Bibliografía

- Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingard P, Dimier-Poisson I. 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. Infect. Immun. 72:4127– 4137.
- Al-Natoura MQ, Suleimana MM, Abo-Shehadab MN. 2002. Flock-level prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in northern Jordan. Prev. Vet. Med. 53:305– 310.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

- Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. 2007. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect.* 9:1614–1622.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110:3234–3244.
- Bozza S, et al. 2004. Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine* 22:857–864.
- Carrión J, Folgueira C, Alonso C. 2008. Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. *Vaccine* 26: 2537–2544.
- Chapman H.D., et al. 2005. Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chicken and turkeys. *Avian Pathology*, 34, 279-290.
- Colino J, Snapper CM. 2006. Exosomes from bone marrow dendritic cells pulsed with diphtheria toxoid preferentially induce type 1 antigen-specific IgG responses in naive recipients in the absence of free antigen. *J. Immunol.* 177:3757–3762.
- Dalloul RA, Lillehoj HS. 2006. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines* 5:143–63.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

-de Bie JJ, Jonker EH, Henricks PA, Hoevenaars J, Little FF, Cruikshank WW, et al. 2002. Exogenous interleukin-16 inhibits antigen-induced airway hyper-reactivity, eosinophilia and Th2-type cytokine production in mice. *Clin. Exp. Allergy*. 32:1651–1658.

-del Cacho E, Gallego M, Sanz A, Zapata A. 1993. Characterization of distal lymphoid nodules in the chicken caecum. *Anat. Rec*. 237:512–517.

-del Cacho E., F. López-Bernad, J. Quílez, and C. Sánchez-Acedo. 1997. A fibronectin-like molecule expressed by *Eimeria tenella* as a potencial coccidial vaccine. *Parasitol. Today* 13: 405.

-del Cacho E, Gallego M, López-Bernard F, Sánchez-Acedo C, Lillehoj HS. 2008. Isolation of chicken follicular dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 334:59–69.

-del Cacho E, Gallego M, Lillehoj HS, López-Bernard F, Sánchez-Acedo C. 2009. Avian follicular and interdigitating dendritic cells: isolation and morphologic, phenotypic, and functional analyses. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 129:66–75.

-del Cacho E, et al. 2011. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC derived exosomes. *Vaccine* 29:3818 –3825.

-Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, Groot C, Geuze HJ. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol*. 165:1259–65.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

- Ehigiator HN, McNair N, Mead JR. 2007. *Cryptosporidium parvum*: the contribution of Th1-inducing pathways to the resolution of infection in mice. *Exp. Parasitol.* 115:107–113.
- Garg R, Banerjee DP, Gupta SK. 1999. Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigen. *Vet. Parasitol.* 81:1–10.
- Glick D, Scott JE. 1970. Phosphotungstic acid not a stain for polysaccharide. *J. Histochem. Cytochem.* 18:455.
- Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP. 2006. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114:209-223.
- Jain S., Y. Li, A. Kumar, and P.B. Sehgal. 2005. Transcriptional signalling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336: 3-8.
- Joyner LP, Norton CC. 1983. *Eimeria mitis* in mixed infections with *E. acervulina* and *E. brunetti* in the fowl. *Parasitology* 86:381–390.
- López CB, Fernandez-Sesma A, Czelusniak SM, Schulman JL, Moran TM. 2000. A mouse model for immunization with ex vivo virus infected dendritic cells. *Cell. Immunol.* 206:107–115.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

-López-Bernad F., E. Del Cacho, M. Gallego, J. Quílez, and C. Sánchez-Acedo. 1996. Identification of a fibronectin-like molecule on *Eimeria tenella*. *Parasitology* 113: 505-510.

-Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.

-Lu H, Zhong G. 1999. Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect. Immun.* 67:1763–1769.

-Lygren B., K. Taskén, and C.R. Carlson. 2005. A fast sensitive method for isolation of detergent-resistant membranes from T cells. *J. Immunol. Methods* 305:199-205.

-Lynch EA, Heijens CAW, Horst NF, Center DM, Cruikshank WW. 2003. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: Requirement of CCR5. *J. Immunol.* 171:4965–8.

-Murk JL, Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ. 2002. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13:303–311.

-Neel N.F., E. Schutyser, J. Sai, G.H. Fan, and A. Richmond. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine & Growth Factor review* 16: 637-658.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

- Ogedengbe JD, Hunter DB, Barta JR. 2011. Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. *Vet. Parasitol.* 178:350–354.
- Petry F, Jakobi V, Tessema TS. 2010. Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Exp. Parasitol.* 126:304–309.
- Remer KA, Apetrei C, Schwarz T, Linden C, Moll H. 2007. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur. J. Immunol.* 37:2463–2473.
- Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer KA, Moll H. 2010. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* 28:5785–5793.
- Shirley MW. 1995. *Eimeria* and *Isospora*, p 4–7. In Eckert J, Braun R, Shirley MW, Coudert P (ed), *Biotechnology. Guidelines on techniques in coccidiosis research*. European Commission, Brussels, Belgium.
- Shirley MW, Bedrnfk P. 1997. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitol. Today* 13:481–484.
- Sorensen T., G.J. Gram, S.D. Nielsen, and J.S. Hansen. 1999. Safe sorting of GFP transduced live cells for subsequent culture using a modified FACS vantage. *Cytometry* 37: 284-290.

Vacuna frente a coccidiosis aviar con exosomas

-Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* 188:2019–31.

-Talebi A, Mulcahy G. 2006. *Eimeria tenella*: B-cell epitope mapping following primary and secondary infections. *Exp. Parasitol.* 113:235–238.

-Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, Amigorena S. 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3:1156–62.