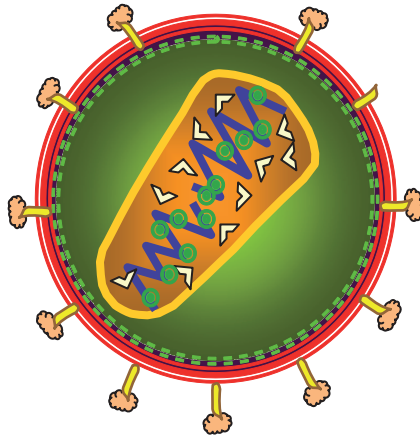


Virus de la inmunodeficiencia Felina (VIF): soplan nuevos y buenos aires

Me toca ahora comentarles acerca de nuestras actividades en investigación relativa a VIF en los últimos 12 años. Este virus fue descubierto en 1986 y comunicado en 1987 por Pedersen y ha despertado un interés enorme en los investigadores, debido a que produce en el gato una enfermedad muy similar al SIDA del hombre. Es un retrovirus linfotrópico y constituye un preciado modelo experimental para el estudio de esta última enfermedad.

Paralelamente a esto ha traído como consecuencia una profundización en el estudio de esta especie, especialmente su sistema inmune. Como todos los retrovirus produce inmunosupresión. En el caso particular de VIF su célula blanco es el linfocito T CD4, célula fundamental en la respuesta inmune.



Esquema del Virus de la Inmunodeficiencia Felina

Este virus se caracteriza por presentar:

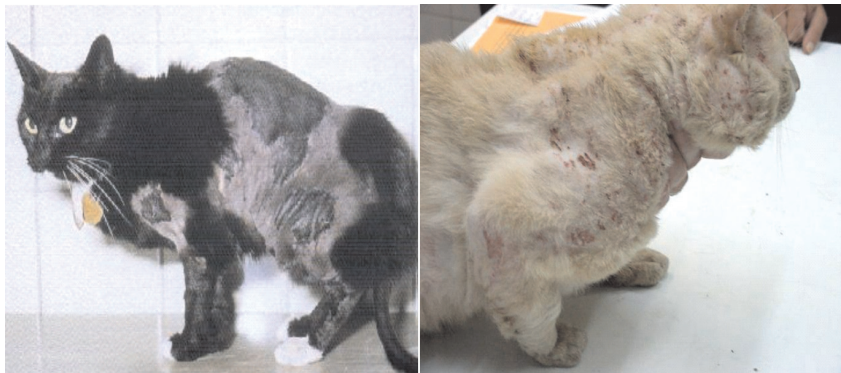
- * Envoltura lipoproteica (con proyecciones) y nucleocápside icosaédrico
- * 2 cadenas de RNA (polaridad positiva) 9.20 kb.
- * Tanto las proteínas de superficie como las de la nucleocápside desencadenan la producción de anticuerpos. Esto se ha tenido en cuenta para hacer cada vez más eficiente el diagnóstico serológico de la enfermedad. La técnica de diagnóstico más empleada es la prueba de Elisa que ha ido sufriendo modificaciones hasta las actuales inmunocromatografías.
- * La replicación viral se produce en varios pasos dirigidos por enzimas de las que está dotado el virus como son: Transcriptasa reversa, Integrasa y Polimerasa.

Los signos clínicos de la enfermedad incluyen:

- * Fase aguda: fiebre, neutropenia, linfadenopatía (inespecífica). Dura meses.
- * Portador asintomático: Severa pérdida de linfocitos T CD4+ sin signos clínicos. De uno a 7 años.
- * SIDA: Pérdida de peso, anemia, gingivitis y luego infecciones crónicas y oportunistas. De 6 meses a un año.



Los pacientes con VIF tienen muchas lesiones en la cavidad bucal, tales como gingivitis (foto central), calicivirus de evolución prolongada y que no responden al tratamiento (izquierda) y granulomas eosinofílicos (derecha) que no son producidos por el virus pero en estos pacientes es una patología frecuente.



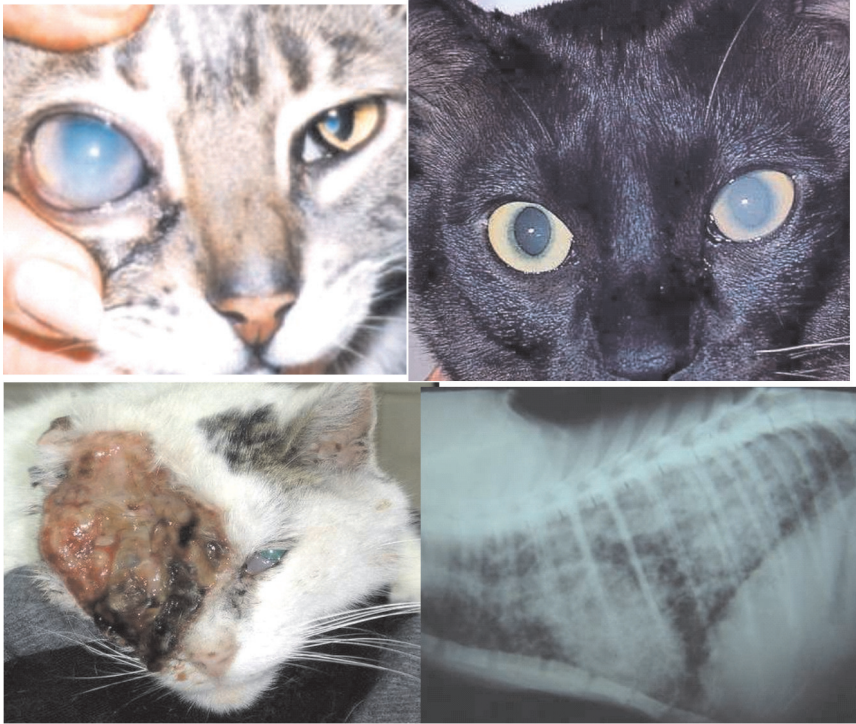
También pueden verse lesiones generalizadas de piel como dermatomicosis (izquierda) o sarna (derecha) poco usuales en animales inmunocompetentes.



Gatos VIF (+) con *Cryptococcus neoformans* como oportunista.



VIF (+) con *Mycobacterium bovis*. Panoftalmítis (izquierda y neumonía con colecta sanguinolenta).

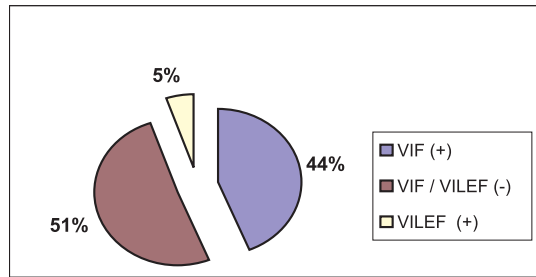


Uveitis (arriba) Tumores de evolución muy rápida (abajo izquierda)
neumonía Intersticial producida por *Toxoplasma gondii* (abajo derecha)

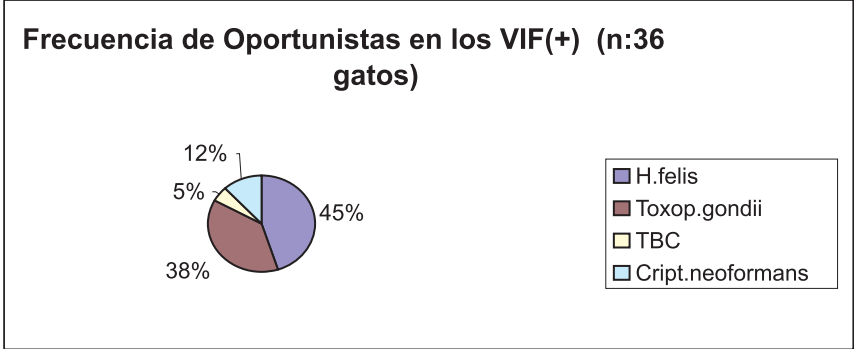
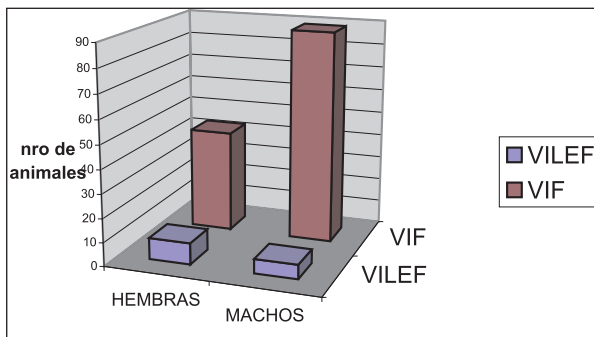
Nuestro interés en investigar esta virosis surge aproximadamente en 1995 y en el período 1996-1998 obtenemos un subsidio para determinar la prevalencia de VIF y ViLeF en poblaciones de riesgo (semiabiertas) en las que muchos animales conviven y algunos salen, pelean con gatos que pueden estar infectados y a su vez pueden transmitir la enfermedad a los integrantes de dichas poblaciones, a través de las mordeduras.

He aquí algunos de nuestros resultados.

Prevalencia de VIF y Vi LeF en poblaciones de riesgo (n=400 gatos)



Prevalencia de VIF y ViLeF según el sexo n: 400

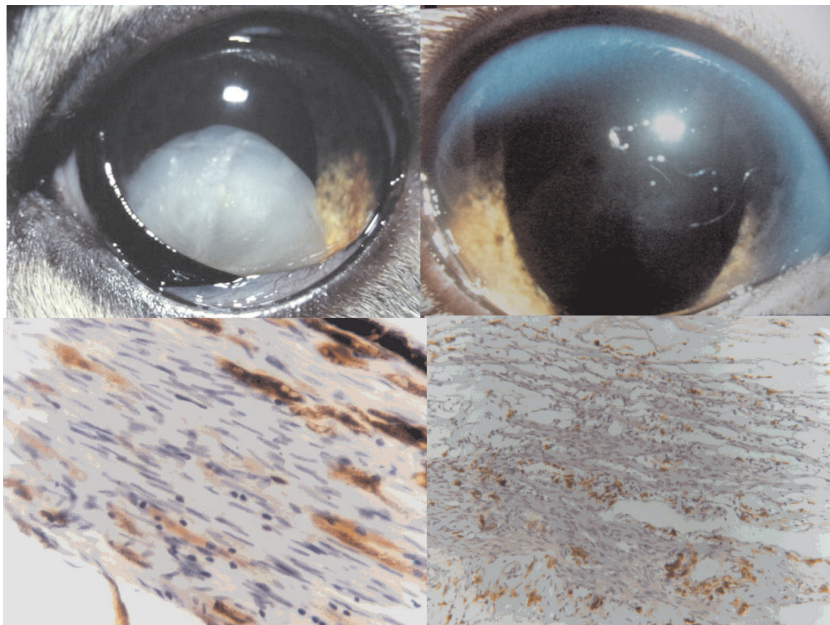


Entre 1996-2000 desarrollé mi tesis doctoral: Virus de la Inmunodeficiencia Felina (VIF): Enfermedades intraoculares producidas por VIF y por sus oportunistas.

DIRECTOR: DR MICHAEL REX LAPPIN CODIR.: DR JAVIER BLANCO VIERA.

Los resultados más salientes de la misma son:

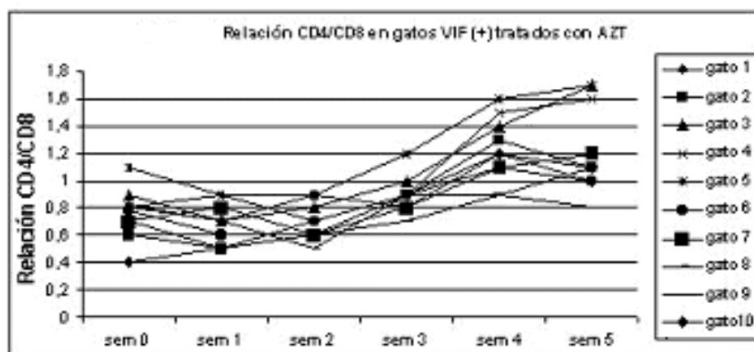
- Predilección del virus por el tracto uveal anterior e intermedio.
- Probable lesión ocular mediada por anticuerpos.
- Infiltración linfoplasmocitaria crónica.
- Una vez descartados los oportunistas, la presencia del virus en el ojo se sospecha por dos métodos: Formación de anticuerpos intraoculares y Prueba de Elisa demostrando el antígeno P24 a nivel del Humor acuoso.
- Prevalencia 27% pars planitis, 27% glaucoma y 46% uveítis anterior.
- Prevalencia de la acción intraocular conjunta de VIF y oportunistas: *Toxoplasma gondii* 50%, *Criptococcus neoformans*. 20%, *Mycobacterium bovis* 10% y PIF 10%



A la izquierda y arriba uveítis anterior por VIF con luxación de cristalino y abajo a la izquierda infiltrado linfoplasmocitario en el iris. A la derecha y arriba glaucoma secundario a uveítis, producido por VIF y abajo la histopatología correspondiente en el ángulo de drenaje.

De esta tesis surge como transferencia una metodología de trabajo para el diagnóstico etiológico de las uveítis en los gatos, y en el caso particular de VIF, pues muchas veces el propietario concurre a consulta por la enfermedad ocular y se hace el diagnóstico de esta enfermedad viral, cuyo diagnóstico precoz permite un tratamiento antes de que el paciente llegue a la etapa final de la enfermedad.

Retomando nuestra historia, hasta ese momento nuestra única técnica diagnóstica era la prueba serológica para la detección de anticuerpos anti- VIF. Los pacientes eran traídos a consulta en etapas muy avanzadas de la enfermedad y teníamos que limitarnos a la prevención del contacto con los agentes oportunistas o al tratamiento de los mismos, por lo general infructuoso o bien de respuesta poco duradera. Por ello, nos abocamos a la tarea de elegir una técnica que permitiera la estadificación de los pacientes y el seguimiento de la evolución de la terapéutica específica, es decir, los antirretrovirales. En este momento se nos otorgó (UBA) un subsidio de investigación para el desarrollo de la técnica de determinación de la relación CD4/CD8 en estos pacientes. Resultó un trabajo difícil dado que los linfocitos de los gatos presentan tres tamaños diferentes y sus plaquetas interfieren mucho con el análisis de la citometría. Estos factores dificultan la determinación de la zona a analizar. Quiero destacar que contamos con la ayuda invaluable del Dr Brian Willett (Facultad de Veterinaria de la Universidad de Glasgow) quien nos ha guiado a fin de lograr resultados correctos en nuestras mediciones. Dicha técnica nos permitió establecer la etapa de la enfermedad que cursaba el paciente y además determinar la duración de la terapia con Zidobudina AZT, hasta ese momento única droga probada en los gatos y cuyo principal efecto colateral es anemia. Definí entonces que nuestro intervalo ideal de tratamiento sería de cuatro semanas de terapia y cuatro semanas de descanso, aún cuando la bibliografía proponía 5 semanas.



También nos hacía falta una técnica de diagnóstico definitivo de la enfermedad y así es que en el año 2000, a través de la tarea de una becaria Estímulo, dirigida por mi y con la supervisión invaluable del área de virología de nuestra Facultad, se desarrolló la Reacción de polimeras en cadena nested-

PCR para la confirmación del diagnóstico de esta virosis. Esta es una técnica de biología molecular que amplifica en forma exponencial un pequeño fragmento del ácido nucleico viral. En el caso de este virus se amplifica el gen *gag* por ser el más estable.

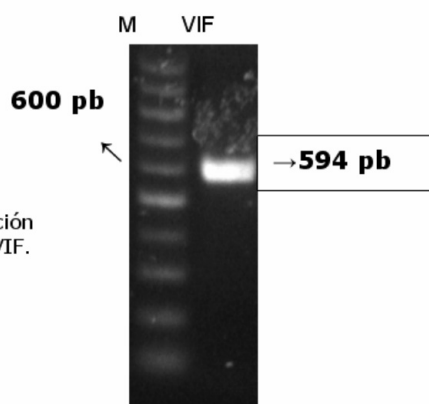
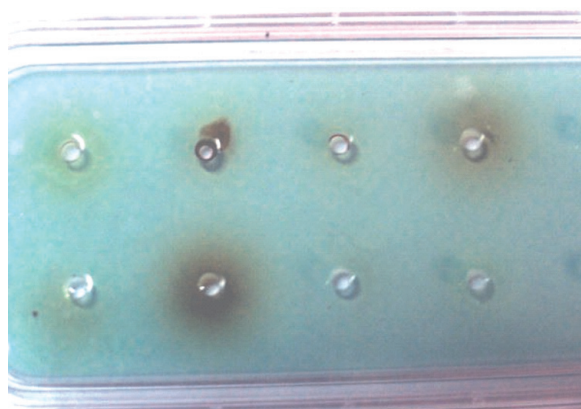


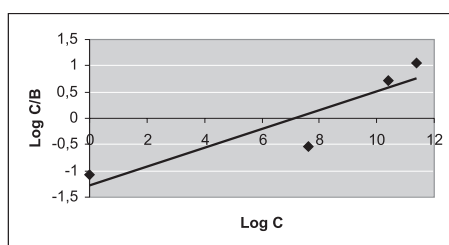
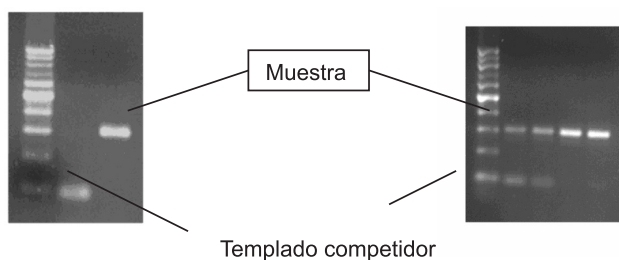
Foto 1: Fragmento de amplificación correspondiente al gen *gag* de VIF. Gel de agarosa al 1%. M: Marcador de peso molecular

Es una técnica costosa y que fundamentalmente se usa para investigación, permitiendo la detección temprana de VIF y la Identificación de cepas presentes en la Argentina.

También en ese mismo período se desarrolló otra técnica que permite evaluar la evolución de esta enfermedad y su curso como es la determinación de una proteína de fase aguda. En el caso del gato la más significativa es la Alfa Glicoproteína ácida (AGP). Se usa para el diagnóstico de Peritonitis Infecciosa Felina pero la encontramos sumamente elevada también en estos pacientes. Se evalúa por medio de una inmunodifusión radial.



En el año 2004, por medio de otro subsidio de la UBA desarrollamos otra técnica que nos permitió completar el conocimiento del estado de estos pacientes, tal como es la Carga Viral, por medio de una PCR cuantitativa competitiva (QC-PCR). Esta consiste en la amplificación conjunta de dos segmentos de distinto tamaño con las mismas secuencias de reconocimiento de cebadores, en un mismo tubo y con iguales condiciones de optimización y amplificación. Uno de los segmentos, el templado competidor (TC) es sintetizado por nosotros y presenta concentraciones conocidas y el otro pertenece a la muestra en la que se busca determinar la carga viral. La cuantificación se lleva a cabo por medio de software de análisis de imágenes por comparación de las intensidades relativas de ambas bandas.



1er Premio Trabajo Investigación AVEACA 2007.

Contando con todas las técnicas descritas, emprendimos seriamente la tarea de probar y encontrar terapéuticas apropiadas para los gatos con esta enfermedad cuando en muchos centros mundiales, todavía no trataban pacientes sino que sólo lo hacían a nivel experimental. A nuestro criterio los objetivos de la terapia deben ser:

- 1-Incrementar la sobrevida y mejorar la calidad de vida del paciente.
- 2-Retrasar la aparición de la etapa final y la aparición de las enfermedades oportunistas.

Se cuenta actualmente con:

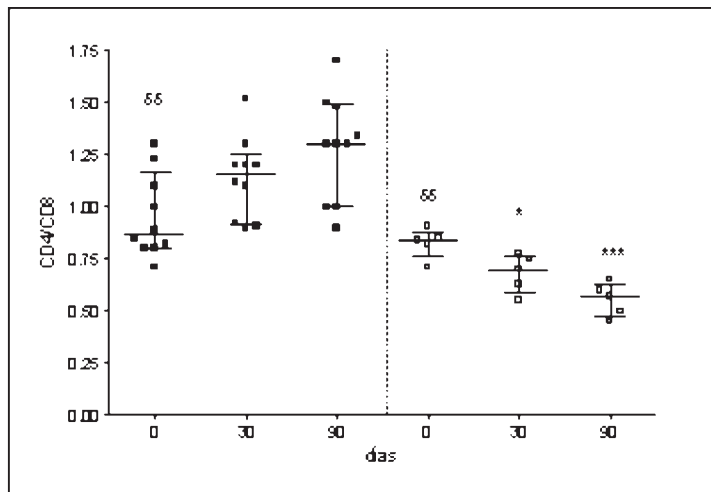
- * Inhibidores de la Transcriptasa Reversa. Entre ellos el AZT es el mejor tolerado por el gato, los demás son muy tóxicos.

- * Inhibidores de las proteasas. Se han probado en forma experimental y los resultados in vivo no son muy buenos, comparados con los resultados in vitro
- * Inhibidores de las Integrasas. Recién ahora se están empezando a evaluar en los gatos.

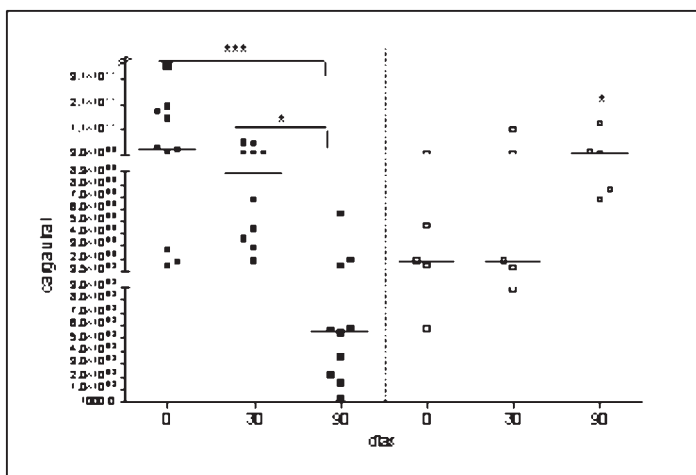
Por todo esto, elegimos tratar a nuestros pacientes con la combinación presentada a continuación:

- * AZT 5 mg/kg c/12 hs. Ciclos de 30 días con 30 días de descanso
- * Acido valproico 15 mg/kg c/24 h. Ininterrumpido. El ácido valproico, una droga anticonvulsionante utilizada en los humanos como tratamiento antiepiléptico, ha demostrado ser un inhibidor de la enzima histona deacetilasa (HDAC), responsable de que VIH permanezca en la fase latente de la infección. El ácido valproico provoca la activación de provirus (que se encuentra silente incorporado al ADN celular y por este motivo es resistente al tratamiento antirretroviral).

En los siguientes gráficos se puede apreciar, por medio de carga viral y relación CD4/CD8 los resultados de este tratamiento. Por otra parte cabe señalar que muy rápidamente se detecta una mejoría evidente de los signos clínicos del animal.



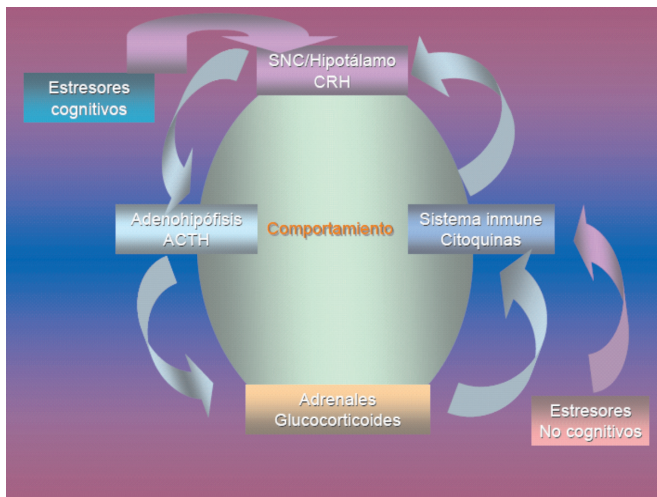
Comparación de CD4/CD8 en gatos tratados (cuadrados llenos) y no tratados (cuadrados vacíos), $P < 0,01$ vs 90 días en tratados y no tratados, *** $P < 0,05$ vs 30 días tratados, *** $P < 0,001$ vs 90 días tratados. Valores expresados como mediana y rangos intercuartiles.



Carga viral (copias de virus/ml de plasma) en felinos tratados con AZT (cuadros llenos) y felinos sin tratamiento con AZT (cuadros vacios). ***P<0,001 0d vs 90d tratados *P<0,05 30d vs 90d tratados y 90d sin tratamiento vs 90d tratados Valores expresados como mediana.

Para finalizar, quisiera comentarles un giro que que hemos dado últimamente a nuestro trabajo.

Resulta común que asociemos la aparición de algunas enfermedades luego de sucesos estresantes. Lo que hasta ahora era sólo una observación empírica, actualmente es profundamente estudiado por una nueva tendencia interdisciplinaria de la ciencia a la que se denomina Psiconeuro-inmunoendocrinología. Es una tendencia hacia la obtención de una visión totalizadora del organismo, de alguna manera una forma de reaccionar a la partición del organismo objeto de estudio de las superespecializaciones. Sin pretender desvalorizar la evolución de las especialidades médicas, es un intento de recuperar el organismo como todo integrado. El reciente y apabullante desarrollo de la biología molecular ha permitido conocer el íntimo detalle de las interacciones entre lo psíquico, lo neurológico, lo endocrino y la inmunidad. Como se aprecia en el esquema presentado a continuación, existen estresores cognitivo (frío, miedo, hambre) que son percibidos por los sentidos e influyen sobre el Sistema Nervioso Central, el Hipotálamo, activándose el eje adrenal, influyendo esto sobre el Sistema Inmune. Pero también puede desencadenarse este efecto a partir de estresares con cognitivos, tales como los agentes infecciosos. En este caso, el Sistema Inmune se comporta como un sexto sentido que percibe la entrada de estos agentes activando el eje.



Nos pareció muy interesante estudiar los efectos de estas interacciones ante la infección de un virus como VIF. Y esto es lo que nos propusimos en el último proyecto de la UBA (2004-2007).

Se estudió el plasma y suero de gatos infectados por VIF a fin de evaluar los niveles de:

- * IL1, TNF α (Elisa), Proteínas de fase Aguda (AGP) (sistema inmune)
- * ACTH plasmática (RIA) y Cortisol (RIA). (sistema endócrino)
- * Potenciales visuales y auditivos evocados. (sistema nervioso)

Observamos lo siguiente:

a-Grupo de pacientes infectados y sin tratamiento

Replicación viral en ascenso
 Aumento marcado de cortisol y ACTH.
 Aumento de IL1, TNF alfa, AGP.
 Disminución de CD4/CD8.

Activación del eje adrenal.

b-Grupo de pacientes infectados con tratamiento

Declinación de la carga viral
 Normalización de ACTH y cortisol
 Normalización de IL1, TNF alfa, AGP.
 Aumento de CD4/CD8.
 Normalización del eje adrenal con la consiguiente
 Disminución del estrés crónico típico de estos pacientes.

En cuanto al presente y futuro de nuestro trabajo en esta línea estamos por comenzar a:

- * Evaluación de otro eje neuroinmunoendocrino: Eje tiroideo.
- * Continuar con los tratamientos de los pacientes teniendo ahora dos métodos: Carga viral y Citometría.
- * Comparar nuestros resultados con los obtenidos en gatos SPF del centro de Retrovirus de la Universidad de Pisa, Italia.
- * Evaluar el eje tiroideo en otras enfermedades felinas, tales como el asma.
- * Investigar los subtipos de virus presentes en nuestro país.

Para finalizar, y en un todo de acuerdo con el pensamiento del Dr. Scholein Rivenson respecto de la ética en nuestra profesión, quisiera aclarar que los trabajos de investigación presentados son evaluados por un comité que precisamente asegura que las actividades que impliquen el uso de animales con propósitos de investigación, enseñanza o servicio a terceros, realizados en el ámbito de la Facultad de Ciencias Veterinarias, se desarrollen en forma humanitaria y en el marco de las normas internacionales de ética. Dicho Comité es el **CICUAL: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación.**