

**Comunicación del Académico de Número
Dr. Héctor G. Aramburu**

**Respuesta inmune celular del bovino
al virus de la fiebre aftosa.**

**Dres. Silvia Mundo, Ana María Jar, Adriana Fontanals,
Marta Braun y Héctor G. Aramburu.**



SESION ORDINARIA
del
9 de Setiembre de 1993

**ACADEMIA NACIONAL
DE
AGRONOMIA Y VETERINARIA**

Fundada el 16 de Octubre de 1909
Avda. Alvear 1711 - 2º P., Tel. / Fax. 812-4168, CP. (1014) Buenos Aires,
República Argentina

MESA DIRECTIVA

Presidente	Dr. Norberto Ras
Vicepresidente	Ing. Agr. Diego J. Ibarbia
Secretario General	Dr. Alberto E. Cano
Secretario de Actas	Ing. Agr. Manuel V. Fernández Valiela
Tesorero	Dr. Jorge Borsella

ACADEMICOS DE NUMERO

Dr. Héctor G. Aramburu	Ing. Agr. Juan H. Hunziker
Ing. Agr. Héctor O. Arriaga	Ing. Agr. Diego J. Ibarbia
Ing. Agr. Wilfredo H. Barrett	Ing. Agr. Walter F. Kugler
Dr. Jorge Borsella	Dr. Alfredo Manzullo
Dr. Raúl Buide	Ing. Agr. Angel Marzocca
Ing. Agr. Juan J. Burgos	Ing. Agr. Luis B. Mazoti (1)
Dr. Angel Cabrera	Ing. Agr. Edgardo R. Montaldi
Dr. Alberto E. Cano	Dr. Emilio G. Morini
Med.Vet. José A. Carrazzoni (1)	Ing. Agr. Antonio J. Prego (1)
Dr. Bernardo J. Carrillo	Dr. Norberto Ras
Dr. Pedro Cattáneo	Ing. Agr. Manfredo A. L. Reichart
Ing. Agr. Luis De Santis	Ing. Agr. Norberto A. R. Reichart
Ing. Agr. Milán J. Dimitri	Ing. Agr. Luis De Santis
Ing. Agr. Manuel V. Fernández Valiela	Dr. Carlos O. Scoppa (1)
Dr. Guillermo G. Gallo	Ing. Agr. Alberto Soriano
Dr. Enrique García Mata	Dr. Boris Szyfres (1)
Ing. Agr. Rafael García Mata	Dr. Ezequiel C. Tagle
Ing. Agr. Roberto E. Halbinger	Ing. Agr. Esteban A. Takacs
Arq. Pablo Hary	(1) Académico a incorporar

ACADEMICOS HONORARIOS

Ing. Agr. Dr. Norman E. Borlaug (Estados Unidos)
Ing. Agr. Dr. Theodore Schultz (Estados Unidos)

ACADEMICOS EMERITOS

Dr. Enrique García Mata
Dr. Rodolfo M. Perotti

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

Ing. Agr. Ruy Barbosa (Chile)	Ing. Agr. Jorge A. Mariotti (Argentina)
Dr. Joao Barisson Villares (Brasil)	Dr. Horacio F. Mayer (Argentina)
Dr. Roberto M. Caffarena (Uruguay)	Dr. Milton T. de Mello (Brasil)
Ing. Agr. Edmundo A. Cerrizuela (Argentina)	Dr. Bruce Daniel Murphy (Canada)
Ing. Agr. Guillermo Covas (Argentina)	Ing. Agr. Antonio J. Nasca (Argentina)
Ing. Agr. José Crnko (Argentina)	Ing. Agr. León Nijensohn (Argentina)
Ing. Agr. Jorge L. Chambouleyron (Argentina)	Ing. Agr. Sergio F. Nome Huespe (Argentina)
Dr. Luis A. Darlan (Argentina)	Dr. Guillermo Oliver (Argentina)
Méd.Vet. Horacio A. Delpietro (Argentina)	Ing. Agr. Juan Papadakis (Grecia)
Ing. Agr. Johanna Dobereiner (Brasil)	Ing. Agr. Rafael E. Pontis Videla (Argentina)
Ing. Agr. Guillermo C. Fadda (Argentina)	Dr. Charles C. Poppensiek (Estados Unidos)
Ing. Agr. Osvaldo A. Fernández (Argentina)	Ing. Agr. Aldo A. Ricciardi (Argentina)
Ing. For. Dante C. Fiorentino (Argentina)	Ing. Agr. Manuel Rodríguez Zapata (Uruguay)
Ing. Agr. Adolfo E. Glave (Argentina)	Dr. Ramón A. Rosell (Argentina)
Dr. Sir William M. Henderson (Gran Bretaña)	Ing. Agr. Jaime Rovira Molins (Uruguay)
Ing. Agr. Armando T. Hunziker (Argentina)	Ing. Agr. Armando Samper (Colombia)
Dr. Luis G. R. Iwan (Argentina)	Ing. Agr. Alberto A. Santiago (Brasil)
Dr. Elliot Watanabe Kitajima (Brasil)	Ing. Agr. Franco Scaramuzzi (Italia)
Ing. Agr. Antonio Krapovickas (Argentina)	Ing. Agr. Jorge Tacchini (Argentina)
Ing. Agr. Néstor R. Ledesma (Argentina)	Ing. Agr. Arturo L. Terán (Argentina)
Dr. Oscar J. Lombardero (Argentina)	Ing. Agr. Ricardo M. Tizzio (Argentina)
Ing. Agr. Jorge A. Luque (Argentina)	Ing. Agr. Victorio S. Trippi (Argentina)
	Ing. Agr. Marino J. R. Zaffanella (Argentina)

COMISION DE PUBLICACIONES

Dr. Héctor G. Aramburu (Presidente)
Dr. Alberto E. Cano
Ing. Agr. Esteban A. Takacs

Artículo N° 17 del Estatuto de la Academia

"La Academia no se solidariza con las ideas vertidas por sus miembros en los actos que ésta realice salvo pronunciamiento expreso al respecto que cuente con el voto unánime de los académicos presentes en la sesión respectiva"

Comunicación del Académico de Número

Dr. Héctor G. Aramburu

Respuesta inmune celular del bovino al virus de la fiebre aftosa.

Dres. Silvia Mundo, Ana María Jar, Adriana Fontanals, Marta Braun y Héctor G. Aramburu.

Entre los mecanismos de defensa de los organismos superiores, uno muy importante es el de la inmunidad específica, esto es, la que se desarrolla *a posteriori* del ataque o agresión de microorganismos causantes de la enfermedad o en razón de la utilización de vacunas. Este mecanismo es primordial para la supervivencia de las especies vertebradas y constituye la última línea de defensa ante la agresión microbiana; vencida, sobreviene la enfermedad, con o sin muerte.

En la fiebre aftosa, una de las enfermedades animales económicamente más importantes que afecta principalmente a vacunos, porcinos y lanares, la inmunidad ha sido estudiada especialmente en lo que respecta a la respuesta humoral, vale decir los anticuerpos (Ac), que se encuentran en los líquidos orgánicos, especialmente en el suero sanguíneo.

Se ha estudiado así la función, la caracterización y la importancia de los Ac, pero la génesis y la índole de los fenómenos inmunes no están totalmente desentrañadas. En la aftosa los estudios se han dirigido más bien a la caracterización de los Ac circulantes pero no al conocimiento de los fenómenos celulares ligados íntimamente a la defensa orgánica, como está demostrado repetidamente.

En efecto, la defensa orgánica mediada por células ha sido muy poco estudiada pues o no ha llamado mucho la atención o ha habido dificultades para su estudio, por lo cual hay poca información. Es probable que lo obvio

de la mayoría de las reacciones Ag-Ac que evidencian la presencia y el tenor de los Ac circulantes y que permiten explicar estados de resistencia o protección, hayan postergado la investigación de aquellos fenómenos a nivel celular.

Esa ha sido justamente la brecha por la cual este grupo de trabajo de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, reunido a los efectos de esta investigación, está lanzado, tratando de determinar cuál es el valor de las defensas celulares en la Fiebre Aftosa.

No se cree necesario abundar en el tema salvo enfatizar sobre el hecho de que la Fiebre aftosa, una de las más serias enfermedades animales, ha puesto escollos insalvables para ciertas exportaciones de carnes. Pese a que esta enfermedad, desde un punto de vista práctico y si se observa su difusión en un globo terráqueo de hace 50 años comparándola con la actual, parece ser una enfermedad "en retirada", sigue constituyendo aún un problema sanitario mundial de primera magnitud.

Un animal que se enferma de fiebre aftosa queda inmune posiblemente para toda o casi toda la vida, al menos hacia la variedad serotípica del virus que lo infectó. En cambio, si se inyecta con vacunas a virus muertos, pese a que las vacunas nacionales actualmente en uso son de muy buena calidad y potencia, no se puede lograr una protección efectiva en el medio epizootiológico local actual, de más de 6 a 12 meses.

Podría aducirse que esta diferencia en la respuesta se debe a que, en el primer caso hay invasión del organismo por el virus, mientras que en el segundo el virus no invade el organismo.

Con vacunas constituidas por virus vivos modificados, se han logrado períodos más largos de protección, pero dichas vacunas implican riesgos de reversión viral y de aumento de su patogenicidad para otras especies; tal su riesgo que su uso no está aprobado internacionalmente.

Por otra parte, siempre que se elaboran las que pueden llamarse vacunas clásicas, a virus enteros, ya sean vivos o inactivos, se presenta en los laboratorios que las producen un riesgo de escape viral, lo que puede provocar peligrosos focos de la enfermedad. Es debido a esto que desde hace años se está intentando producir una vacuna antiaftosa por métodos biotecnológicos que no implican, en la manipulación en gran escala, riesgo de escape viral, ya que sólo se manejan y utilizan porciones virales proteicas no infectantes. Desgraciadamente hasta el momento, estas vacunas son muchísimo menos efectivas que las vacunas elaboradas con virus entero.

La pregunta que se hacen muchos de los que están en estas investigaciones y que por supuesto compartimos, es por qué sucede todo esto. Según nuestro parecer se choca con esta serie de inconvenientes porque no se conocen suficientemente los mecanismos intrínsecos de la respuesta inmune del bovino al virus de la fiebre aftosa (VFA).

Hoy se acepta que el nivel de Ac neutralizantes es el mejor parámetro para que pueda predecirse si un animal estará o no protegido frente a una descarga viral o desafío, pero no se conocen los mecanismos que inician esta respuesta inmune humoral contra el VFA en el bovino. Si bien los linfocitos

B y las células en que se transforman, los plasmocitos, son los encargados de la producción de Acs, ellos necesitan casi siempre de la colaboración de los linfocitos T para poder responder con producción de Acs contra la mayoría de los antígenos (Ag), que son timodependientes. Mediante esta colaboración entre linfocitos T y B se pone en marcha y se mantiene la producción de los Acs circulantes antes mencionados.

Los linfocitos T tienen también funciones efectoras, pues son capaces de lisar las células invadidas por virus. Esta función es muy importante en la eliminación de células infectadas por partículas virales y se ha demostrado su papel primordial en la mayoría de las infecciones virales, pero no se sabe aún qué importancia tienen dichos mecanismo celulares frente a una invasión con el VFA. Por fin, el sistema T es fundamental en el establecimiento y funcionamiento de la llamada memoria inmune, importantísima característica del sistema de defensa orgánico, sobre la cual se asienta la posibilidad de inducir protección mediante vacunas.

El problema de la importancia del sistema T en la respuesta específica al VFA se comenzó a estudiar en el INTA en un modelo murino. En dicho modelo se pudo demostrar que los linfocitos B, por sí solos, pueden producir Acs, y por consiguiente protección, contra el virus; esto se demostró en ratones congénitamente atímicos, los que respondieron al VFA en forma casi idéntica a la de ratones con su sistema T normal. Además, esta protección pudo transferirse de un animal inmune a uno irradiado, por medio de la repoblación con linfocitos B y T o con linfocitos B purificados, pero no con linfocitos T solos. Vale decir, los animales que sólo tenían linfocitos B podían llegar a desencadenar, sin la colaboración de los linfocitos T, la síntesis de Acs contra el VFA. Es más, se

comprobó que la memoria inmunológica de ratones atímicos era muy similar a la de animales normales. Se propuso entonces que el VFA sería un Ag timo-independiente "optativo". Nada de esto sucede en la mayoría de las enfermedades virales hasta ahora estudiadas y se admite generalmente que la base de la memoria inmune, cuya importancia ya fue mencionada, es el sistema T.

Pese a lo interesante de estas comprobaciones, surgió la duda sobre la validez de estos estudios en el ratón, ya que se trata de una especie naturalmente no susceptible al VFA. Esta fue la razón por la cual se comenzaron en la Facultad de Ciencias Veterinarias de Buenos Aires, a estudiar los mecanismos celulares de la respuesta inmune del bovino al VFA, es decir, en el huésped óptimo, por ser altamente susceptible al virus. Para ello se usaron los bovinos que utiliza el SENASA en las pruebas rutinarias de potencia de las distintas partidas de vacunas antiaftosa comerciales sometidas a su control. Es apropiado agradecer a dicho organismo la cesión temporal de esos vacunos.

En una primera etapa, se estudiaron las subpoblaciones celulares en diferentes grupos de bovinos: vacunados, vacunados y desafiados, no vacunados y enfermos. Los animales vírgenes de contacto previo con el VFA y los primovacunados fueron estudiados antes y 7 días después de un desafío con VFA. Se observó que había alteraciones en sus subpoblaciones de linfocitos B y T circulantes, incluyendo alteraciones en los linfocitos T γ δ ; esto último resulta de difícil interpretación pues no se sabe bien que función tienen.

En una segunda etapa, se estudiaron las respuestas inmunes celulares de 3 grupos de bovinos, a saber:

a) animales provenientes de la Patagonia, que nunca tuvieron contacto con el VFA, b) animales inyectados con una sola dosis de vacuna antiaftosa y c) animales provenientes de la Provincia de Bs. As., polivacunados, luego de mucho tiempo desde su última vacunación. Todos ellos fueron desafiados con VFA y se estudió *in vitro* la proliferación de linfocitos T en presencia de VFA, así también como la inhibición de la migración leucocitaria antes y después del mencionado desafío con el VFA; estas dos técnicas miden *in vitro* reacciones de inmunidad celular, pero no puede decirse si son reacciones efectoras o indican estimulación de los linfocitos T colaboradores.

El resultado fue que los animales vírgenes fueron siempre negativos, es decir no presentaron reacciones de estimulación. Por el contrario, los animales polivacunados que enfermaron luego del desafío viral, reaccionaron en forma fuertemente positiva; estos fueron utilizados luego en el curso del estudio como controles positivos.

De los animales experimentales, es decir los bovinos provenientes de zonas libres y primovacunados, unos pocos mostraron reacciones débilmente positivas (apenas por encima de un índice de proliferación de 2) y la mayoría fueron negativos, pero debe mencionarse que los bovinos inyectados con vacuna oleosa (adyuvante oleoso) mostraron respuestas linfoproliferativas levemente superiores a los inyectados con vacuna acuosa (adyuvante hidróxido de aluminio-saponina).

Por otra parte, se midió la respuesta inmune celular inespecífica, por medio de la estimulación *in vitro* de los linfocitos con factores mitogénicos policlonales. Los animales inyectados con vacuna oleosa también respondieron en forma más fuertemente positiva a estos

factores inespecíficos que los inyectados con vacuna acuosa.

Se sabe ya desde hace tiempo que hay una correlación estrecha entre el título de Ac neutralizantes y la protección existente o conferida, por lo que se quiso saber si también había correlación con las respuestas celulares. Para ello, se compararon las respuestas proliferativas y de inhibición de la migración leucocitaria de animales protegidos con las de animales no protegidos. Se pudo observar que no hubo correlación entre la respuesta celular y la protección.

Con el objeto de saber si la infección con virus vivo podía dar lugar a la aparición de respuestas celulares, todos estos grupos de animales fueron estudiados 7 días post-desafío. En dicho momento los animales están enfermos, pero están comenzando a recuperarse de la virosis. Este también es el momento en que comienza a haber secreción de Ac, es decir, cuando aparecen las respuestas humorales al VFA en animales vírgenes. Sin embargo, mediante las técnicas que detectan inmunidad celular, no se pudo observar positivización de las respuestas de los animales vírgenes y tampoco siquiera aumento del índice de respuesta de los animales prevacunados que eran levemente positivas.

La falta de respuestas positivas en animales 7 días después del desafío, momento en que la respuesta celular a la mayoría de los Ags es evidente en casi todos los modelos experimentales, sugirió la necesidad de estudiar en forma longitudinal, es decir en el tiempo, la aparición y la duración de las respuestas de tipo celular del bovino al VFA, estudio para los cuales fue decisivo el apoyo económico brindado por la Academia Nacional de Agronomía Y Veterinaria.

Para ello se estudiaron animales de los mismos grupos arriba mencionados,

que se mantuvieron estabulados por 45 o más días y se sangraron semanalmente. Durante todo este tiempo se midieron sus respuestas linfoproliferativas y de secreción de IL2, con lo que se logró observar la cinética de ambas respuestas.

De esta manera se estudiaron 2 animales polivacunados de la Provincia de Bs. As., que no resistieron a un desafío con VFA. Estos bovinos mostraron respuestas altamente positivas durante 6 o más meses.

Luego y de la misma manera, se estudiaron 4 animales vírgenes de contacto previo con VFA, que fueron infectados experimentalmente. En ellos, la cinética de la respuesta mostró la aparición de un pico importante de reacciones positivas en la cuarta semana, pero las respuestas se negativizaron a la quinta semana.

Actualmente se están estudiando bovinos primovacunados que no resistieron al desafío con VFA. Estos muestran un pico de respuesta similar al de los animales no vacunados pero más tardío: aparece a la 5ª semana y no se mantiene.

En los próximos meses se continuará el estudio en otros grupos de animales, fundamentalmente primovacunados que resistan al desafío.

Esta serie de observaciones demuestra que la respuesta inmune mediada por células no parece tener una importancia fundamental ni para la protección frente a un desafío o contacto con el virus, ni para la curación de un animal enfermo con fiebre aftosa, puesto que sólo se hace mensurable a partir de la 4ª semana de la enfermedad, es decir, cuando el animal ya está recuperado o en franca vía de curación. Llama muchísimo la atención que pueda haber una importante síntesis de Ac sin que se haga patente la estimulación del sistema T, que, como se sabe, es

un colaborador necesario para la síntesis de Ac contra todos los Ags, salvo los timoindependientes. Parecería entonces que en el bovino puede haber síntesis de Ac sin colaboración T, por lo que, en esta especie, el VFA sería también un Ag timoindependiente "optativo".

Con el objeto de tratar de demostrar si el sistema T tiene o no importancia en la colaboración para la producción de Acs contra el VFA, se ha planeado estudiar la síntesis *in vitro* de Acs anti VFA, mediante cultivos con linfocitos T y B purificados estimulados con el Ag.

Otro hecho importante que se desprende de estos estudios es la gran diferencia en las respuestas de los animales que habían recibido varias dosis de vacuna y las de los bovinos vírgenes luego de su infección con VFA; en los primeros, la respuesta celular fue mucho más alta y muchísimo más prolongada. Parecería entonces que el

sistema inmune responde de manera diferente si su primer contacto con los Ags del VFA es con virus vivo o si es con virus aftoso inactivado, inyectado con adyuvantes. Esta forma diferente de primoestimulación modularía al sistema inmune en forma tal que luego, frente a la invasión profunda del organismo por el virus, las diferencias se hacen manifiestas. Este hecho se ve apoyado por estudios recientes realizados en el INTA que muestran, en el modelo murino, que la respuesta a virus inactivado es una clásica respuesta timo-dependiente (Sadir, A.M. et al, comunicación personal). Esta diferente modulación de la respuesta inmune podría ser la base del diferente grado de protección que generan las vacunas y el generado por el virus vivo.

Se confía que en el futuro se pueda seguir mereciendo el apoyo económico de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria para la prosecución de estos estudios.