

## **Disertación del Académico de Número Dr. Eduardo L. Palma**

**Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria  
Sr. Secretario General,  
Sra. Presidente de la Sociedad de Medicina Veterinaria,  
Sres. Académicos, Sras., Sres.,  
Colegas y Amigos:**

Agradezco sinceramente al Sr. Presidente de la Academia y Padrino de mi incorporación, Académico Norberto Ras y al Sr. Secretario General de la Academia Dr. Alberto Cano por los elogiosos conceptos vertidos sobre mi trayectoria profesional y mi persona. De igual manera quisiera extender mi agradecimiento a este cuerpo colegiado que propugnó mi designación para ocupar un sitial en esta Academia, hecho que significa el mayor honor que pueda recibir en mi carrera profesional. En este acto, me comprometo a realizar los mayores esfuerzos para contribuir al logro de los fines de la Academia, con la convicción que, en momentos que el país necesita imperiosamente impulsar la educación, el conocimiento científico y el desarrollo tecnológico, el rol de la Academia es esencial para asegurar la excelencia en esas áreas.

Este es sin duda el momento más trascendente y emotivo de mi carrera profesional, en el cual se mezclan recuerdos y sentimientos de agradecimiento a quienes en diferentes etapas contribuyeron de alguna manera a ésta, para mi inmerecida e inesperada designación como miembro de esta prestigiosa Academia. Deseo expresar mi agradecimiento a mi familia, en particular mi esposa, por su continuo apoyo; a quienes fueron mis maestros en las diferentes etapas de mi carrera profesional, el Dr. Osvaldo Peso, la Dra. Alice Huang, el Dr. Bernardo Carrillo y mi

padre, el Dr. Eduardo Palma Zuloaga; a las Instituciones donde me he formado y trabajado, el Colegio Nacional Buenos Aires, que además de brindarme una buena formación y educación, me dio las bases para valorar lo que significa ser un profesional universitario, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, el CONICET y el INTA, siendo esta Institución la que me brindó todas las condiciones para desarrollar mi actividad como investigador y por último a mis compañeros de trabajo a quienes deseo hacer partícipes de este momento de tan alta significación.

Tal como es tradicional en la Academia y es una disposición estatutaria, acertadamente a mi entender, antes de iniciar mi disertación realizaré una breve semblanza de los Sres. Académicos que me han precedido en el "sitial N° 12".

Entre 1941 y 1974, año de su fallecimiento, el sitial fue prestigiosamente ocupado por el Ing. Agr. Miguel Florencio Casares. El Ing. Agr. Casares fue un hombre de una vasta cultura, comprometido durante toda su vida con el desarrollo rural. Fue colaborador del Dr. Carlos Pellegrini y cofundador junto a otros miembros de su familia de la Industria láctea "La Martona", que durante muchos años fue una empresa líder en el país, reconocida por la introducción de numerosos avances tecnológicos.

El sitial 12 fue nuevamente

ocupado en 1992 por el Ing. Agr. Roberto Erwin Halbinger a quien no tuve el honor de conocer personalmente, pero a quien valoro tanto por su calidad humana como por su actividad profesional a través de la lectura de su biografía y de los comentarios que me han hecho sus pares, de esta prestigiosa Academia. El Ing. Agr. Halbinger egresó de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires en 1949, sin embargo, su carrera docente comienza en 1947 como ayudante y alumno en la cátedra de Microbiología Agrícola y en forma ininterrumpida culmina en 1986 como Profesor titular en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Facultad de Agronomía de la UBA. En 1986 fue Director de la Escuela de Licenciatura en Tecnología Industrial de los Alimentos de la UADE hasta 1992, año en que fue designado Profesor Consulto de dicha Universidad.

Simultáneamente con las actividades docentes mencionadas, el Ing. Halbinger dictó cursos de pre y postgrado, como profesor invitado en diferentes Facultades, del País y del exterior. Además de la enseñanza universitaria, participó activamente en la elaboración del plan de estudio de la Escuela de Agronomía en 1967, en la definición de las incumbencias profesionales de los Ingenieros Agrónomos, y en distintas comisiones de la Universidad hasta 1983 en que es designado Consejero Académico Titular de la Facultad de Agronomía.

Como investigador, su vocación estuvo siempre dirigida hacia la Microbiología, vocación que seguramente se despertó en su niñez, cuando a los 12 años de edad tuvo en sus

manos un microscopio, regalo de su madre, que le permitió descubrir el apasionante mundo de los microbios. Su labor científica se ve reflejada en más de 60 artículos y libros científicos en temas relacionados con la microbiología agrícola e industrial, con particular énfasis en el área de los alimentos. Participó como coordinador y conferencista en numerosos Congresos relacionados con Tecnología de Alimentos, tanto en el país como en el exterior.

Pero un aspecto que quisiera resaltar fue su capacidad para identificar y vincular las demandas del sector productivo con la oferta tecnológica del sector científico. Poder conectar el conocimiento, la tecnología y la productividad, tuvo como consecuencia el reconocimiento por parte de industrias del país como del exterior, donde actuó como consultor en reconocidas empresas agroalimentarias.

En cuanto a mi relación con el sitio 12, si definimos la Biotecnología como la utilización de la Biología para la producción de bienes y servicios, el Ing. Agr. Halbinger fue un biotecnólogo, de la misma manera que lo fue el Ing. Agr. Casares, especialidad con la que me siento identificado al ocupar el mismo sitio.

Este es un breve e incompleto homenaje al Ing. Agr. Halbinger, quien tal como lo destacó el Académico Angel Marzocca con motivo de su incorporación fue "un hombre de bien, dotado de una virtud singular, la búsqueda constante de la Verdad transitando seria y conscientemente los caminos de la Ciencia y su metodología experimental".

# ADN: Nuevas estrategias para el control de enfermedades infecciosas en animales y vegetales.

## I. INTRODUCCION

Uno de los principales problemas que tuvo que enfrentar el ser humano durante sus diferentes etapas evolutivas fue asegurarse la provisión de alimentos. El problema aún persiste ya que, a pesar de los avances tecnológicos alcanzados durante el presente siglo, aproximadamente un 30% de los 5.800 millones de habitantes carece de fuentes de alimentos adecuadas. Estimaciones basadas en el incremento poblacional, indican que para abastecer 10.000 millones de personas en el año 2050 se deberá por lo menos duplicar la producción actual de alimentos (1).

Para asegurar ese nivel de producción en condiciones de disminución de las áreas cultivables y de continuo deterioro del suelo por el uso de prácticas no conservacionistas, es necesario desarrollar e implementar nuevas tecnologías para el sector agropecuario. La dimensión del problema se puede ilustrar si consideramos que en los próximos 50 años, la producción de alimentos para abastecer la población mundial deberá ser el doble que la que se produjo desde el comienzo de la agricultura en el período neolítico hace 10.000 años.

Retrotrayéndonos nuevamente en el tiempo, durante el período de transición del hombre de nómada a sedentario, coincidente con la aparición de los primeros cultivos y la domesticación de los animales, el hombre tuvo que enfrentar un nuevo desafío: combatir las enfermedades que destruían su fuente de alimentos. Durante el siglo pasado las pérdidas ocasionadas por las epidemias de Fiebre

Aftosa o la hambruna causada en Irlanda como consecuencia de la infección de los cultivos de papa por el hongo *Phytophthora infestans*, son sólo algunos ejemplos del efecto devastador de las enfermedades en el sector agropecuario. Desde el punto de vista económico, las pérdidas ocasionadas por enfermedades infecciosas en los principales cultivos fueron de 76.900 millones de dólares durante el período 1988-90 (2).

Las estrategias utilizadas para combatir las enfermedades infecciosas en animales y plantas fueron muy diferentes. Mientras que en animales, el método más efectivo fue la activación del sistema inmune mediante la vacunación, en vegetales el control de enfermedades infecciosas se basó principalmente en la selección de variedades resistentes al patógeno y en la eliminación de los vectores portadores de virus por medio del uso de insecticidas y en el caso de enfermedades fúngicas, mediante el uso de agentes antimicóticos. Un breve análisis de los métodos de control utilizados en animales y vegetales nos muestra que, mientras en animales la vacunación es un método preventivo de bajo costo y no afecta el medio ambiente, en vegetales los métodos utilizados son de alto costo y nocivos para el medio ambiente y la salud humana. Por otra parte, como consecuencia de la evolución del huésped y del patógeno, los métodos de mejoramiento vegetal tendientes a seleccionar variedades resistentes deben tener continuidad en el tiempo y tanto la demora en la selección de

variedades aptas, como el bajo nivel de resistencia al patógeno de dichas variedades, indican que deben buscarse nuevas estrategias para el eficaz control de fitopatógenos.

## II. MECANISMOS DE DEFENSA A LA INFECCION

Como consecuencia de la introducción de un agente infeccioso en una planta o en un animal se desencadenan una serie de procesos antagónicos por parte del huésped y del patógeno. Por una parte, el huésped activa sus mecanismos de defensa tendientes a la eliminación del patógeno y por otra parte el patógeno se multiplica en el huésped a diferentes velocidades, según el tipo de microorganismo, tratando de evadir dichas defensas. El establecimiento de una infección productiva, depende en definitiva de la competencia entre la velocidad con que el huésped desarrolla una respuesta efectiva tendiente a la eliminación del patógeno y la capacidad de éste para multiplicarse e invadir al huésped.

Aunque los mecanismos de defensa a agentes patogénicos que emplean los vegetales difiere de la respuesta inmune de los mamíferos, a medida que se incrementa el conocimiento sobre esos mecanismos a nivel molecular, se observan cada vez mas semejanzas entre los mismos.

Tanto en vegetales como en animales se puede identificar una respuesta a la infección inespecífica y una específica, una respuesta constitutiva y una inducida.

### II. 1 Mecanismo de defensa a la infección en vegetales.

En vegetales, la primer barrera de defensa llamada defensa constitutiva es inespecífica, ya que se pone en

funcionamiento independientemente del tipo de patógeno. Consiste en barreras estructurales, como es la cutícula cerosa y barreras bioquímicas por acción de sustancias de actividad antimicrobiana ("fitoanticipinas"), como los fenoles, saponinas, compuestos flavonoides, cianoglicósidos, etc. (3). Una segunda barrera de defensa la constituye lo que se denomina defensa inducida. Este tipo de defensa se induce por la presencia del patógeno o sus productos y resulta en la activación de genes del huésped, que responden al estrés y genes de resistencia (R) específicos para el patógeno (4).

La interacción huésped-patógeno es un tema de investigación continua en fitopatología. A principios de la década del 40, Flor (5) desarrolló la hipótesis, aún vigente, por la cual la cascada de eventos que conducen a la eliminación de un patógeno es consecuencia de una interacción del tipo "gen por gen", ya que productos de expresión del patógeno llamados factores de avirulencia (Avr) interaccionan con los productos de expresión de los genes de resistencia (R) de la planta siendo la interacción del tipo ligando-receptor.

Los productos de expresión de los genes R actuarían como receptores para ligandos (antígenos?) especificados por los genes Avr y como resultado de esa interacción se estimularían las diferentes señales que activarían los mecanismos de defensa del huésped (4).

La caracterización molecular de los genes R y Avr y el estudio de mecanismos de transducción e identificación de las moléculas involucradas en la interacción y activación de los genes R son temas de investigación actual. Basándose en las características comunes entre los genes R identificados y secuenciados, se los ha dividido en 5 clases y correlacionado con los genes

Avr correspondientes del patógeno (6). Muchos genes R que son miembros de una familia multigénica forman *loci* complejos. Dichos arreglos proveen de sustrato para frecuentes eventos de recombinación que dan lugar a nuevas especificidades a través de recombinación inter e intragenética y duplicación de genes. Este mecanismo, permite que las plantas puedan tener una ventaja selectiva para poder enfrentar la aparición de nuevas razas de patógenos de manera semejante a lo que ocurre con los genes que codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad en mamíferos, cuya evolución es muy parecida (2).

La activación de los genes R y antiestrés generan una respuesta local y otra a distancia. La respuesta local, llamada respuesta de hipersensibilidad (RH), se caracteriza por conducir a la apoptosis de las células infectadas y sus vecinas, con el objeto de aislar el foco de infección. Se ha encontrado gran semejanza entre los genes que regulan la apoptosis en mamíferos y vegetales (7). Además, observaciones recientes indican que la toxina fúngica fumonisina, causa apoptosis tanto en células animales como vegetales (8). Una vez disparada la respuesta local, muchas veces se observa una respuesta a distancia, lejana al foco de infección, llamada resistencia sistémica adquirida (RSA) que también es inespecífica.

Además de la respuesta de hipersensibilidad, las plantas ponen en funcionamiento otros mecanismos bioquímicos de defensa inespecíficos y específicos, tales como: i) la activación y síntesis de intermediarios oxidativos, con la producción de oxígeno reactivo (producción de NADPH a través del camino de la hexosa monofosfato) activación de peroxidasas, lipooxigenasas, producción de intermediarios que activan otras defensas, etc. ii) modifica-

ciones en la pared celular: acumulación de polisacáridos, ligninas, siliconas, entrecruzamiento de proteínas, etc. tendientes a fortalecer la pared celular e impedir la penetración del patógeno o sus metabolitos. iii) producción de fitoalexinas, sustancias de acción antimicrobiana de bajo peso molecular del tipo: isoflavonoides, acetilenos conjugados, etc. y iv) activación de la síntesis de proteínas específicas para cada tipo de patógeno: quitinasas, glucanasas, defensinas, tioninas, etc. (4).

## **II.2 Mecanismos de defensa a la infección en animales**

En mamíferos, la primera barrera de defensa, es la inmunidad innata, la cual se caracteriza por ser inespecífica, tal como ocurre en vegetales con la "defensa constitutiva" y comprende también barreras estructurales y bioquímicas como la piel, vellosidades, el jugo gástrico, el mucus, ácido láctico y ácidos grasos provenientes de las secreciones sudoríparas y sebáceas. Cuando el patógeno penetra al organismo, las células fagocitarias (p.e. macrófagos, neutrófilos) tienen por función la destrucción del microbio o de la célula infectada con la intervención de factores del complemento. La fagocitosis se ve facilitada por la acción de intermediarios de oxígeno reactivo (anión superóxido,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y radicales hidroxilo) que por su alto potencial de oxidación actúan como agentes microbicidas, también se producen agentes halogenantes de alto poder bactericida y virucida. Otro tipo de acción microbicida inespecífica es la producción de enzimas de bajo peso molecular llamadas "defensinas", que alteran la permeabilidad de las membranas microbianas como es el caso de la lisozima, que destruye la pared celular de bacterias.

Además de la acción defensiva inespecífica celular, se ponen en funcionamiento mecanismos extracelulares inespecíficos que facilitan la acción fagocitaria ( $\alpha$ 1 antitripsina, fibrinógeno,  $\alpha$ 2 macroglobulina o la proteína C reactiva). En particular, las endotoxinas bacterianas inducen la producción de citoquinas (interleuquina 1 o 6) y los virus la síntesis de interferones que inhiben su replicación y facilitan la destrucción del patógeno mediante la actividad citotóxica natural (p.e. células NK).

Estos procesos, son los desencadenantes de la inflamación y posterior destrucción celular, muchos de los cuales pueden relacionarse con algunos de los mecanismos bioquímicos de defensa en plantas que producen la respuesta de hipersensibilidad (RH).

La segunda etapa de defensa, es la inmunidad adquirida ("defensa inducida" en vegetales). Este tipo de respuesta es específica para el patógeno y se desarrolla en dos niveles interrelacionados, la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Se caracteriza, a diferencia de la inmunidad innata, por su capacidad de establecer una memoria inmunológica para el antígeno inductor de la respuesta. En general, a nivel extracelular, los patógenos son neutralizados por anticuerpos, que son sintetizados por células plasmáticas derivadas de los linfocitos B. Estos presentan inmunoglobulinas de superficie que actúan como receptores específicos, a los que se une el antígeno, lo cual desencadena el complejo mecanismo de expansión clonal e inducción, finalmente, de linfocitos B de memoria.

Los patógenos intracelulares en general son controlados por los linfocitos T, que se activan mediante la interacción de sus receptores (TCR) con los antígenos procesados expuestos en la membrana de una célula presentadora

en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), dando lugar a la multiplicación clonal y posterior especialización en linfocitos T colaboradores (Th), T citotóxicos (Tc) y de memoria.

Tanto la respuesta humoral como la celular, está regulada por linfocitos Th mediante la producción de linfoquinas, las que tienen un rol preponderante tanto en la iniciación de la respuesta inmune como en el mantenimiento de la misma. Según el tipo de linfoquinas que produzcan las células Th, éstas se pueden diferenciar en Th1 (p.e. interleuquina 2 (IL-2),  $\gamma$ -interferón ( $\gamma$ -IF) y Th2 (p.e.: IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). En ratones, la respuesta del tipo Th1 aumenta la actividad de los macrófagos para la destrucción de los parásitos intracelulares y mediante la secreción de  $\gamma$ -IF se incrementa la producción de gamaglobulinas del isotipo IgG2a e IgG3, como así también la actividad citotóxica. En la respuesta del tipo Th2 por medio de la acción de IL-4 se activan los linfocitos B que producen IgG1 e IgE. El tipo de respuesta Th que se induzca durante la infección es crítica para determinar el progreso de una infección microbiana. Por ejemplo, cepas de ratones que desarrollan una respuesta del tipo Th2 no sobrevivieron a la infección con *Leishmania sp.* (parásito intracelular), mientras que cepas de ratones que desarrollan respuestas del tipo Th1 se inmunizaron (9).

Independientemente que como consecuencia de la infección se producen ambos tipos de respuesta Th, es muy importante poder determinar que tipo de respuesta es la más efectiva para eliminar un determinado tipo de patógeno. Este concepto debe tenerse en cuenta en el diseño de las vacunas a utilizar para cada patógeno en particular.

### III. PREVENCIÓN SANITARIA

El concepto de prevención implica que los mecanismos de defensa del organismo, deben estar activados previamente a la interacción con el patógeno, de manera que el huésped genere una rápida respuesta a la infección. Dicho concepto tan afianzado en sanidad animal actualmente se extiende también a sanidad vegetal. A pesar de la eficacia de las barreras de defensa en plantas y animales, ya que de la interacción con patógenos, sólo unos pocos establecen infecciones, el hombre ha utilizado diferentes estrategias para el control de las enfermedades infecciosas. Dichas estrategias, como se mencionó precedentemente, se han basado en dos aspectos: potenciar las respuestas de defensa del huésped tanto específicas como inespecíficas y activar los mecanismos de memoria, de manera que los mecanismos de defensa estén activos frente a la introducción de un patógeno.

En mamíferos, la vacunación es el método preventivo más económico y eficiente. Diferentes tipos de vacunas han sido utilizadas desde hace casi doscientos años, cuando Jenner por primera vez utilizó una vacuna atenuada para la viruela.

El concepto básico para el diseño de una vacuna es simular ante el huésped la infección por un patógeno, de tal manera que se pongan en funcionamiento todos los mecanismos para su eliminación, activándose luego simplemente su memoria. Es conocido que en el caso de muchas enfermedades virales, una vez activada la respuesta inmune adecuada, el organismo queda protegido de por vida frente a una nueva infección por la misma cepa del virus infectante. La mayor aproximación al estado de infección natural es el uso de vacunas atenuadas y un ejemplo de su

eficacia fue la erradicación de la viruela en el mundo.

En el **Cuadro 1**, se resumen las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de vacunas utilizadas hasta el presente. Tal como surge del análisis de dicho Cuadro, no hay actualmente un solo tipo de vacuna que sea aplicable a los diferentes tipos de patógenos animales, debiéndose conocer por ello los mecanismos de interacción huésped-patógeno y las características patogénicas del agente infeccioso a fin de poder seleccionar el método de inmunización más conveniente.

Durante los últimos 30 años, con el advenimiento de las tecnologías de ADN recombinante y los avances logrados en Biología y Genética Molecular y en Inmunología se abre un nuevo panorama que permite utilizar estrategias impensadas hasta hace poco tiempo. En particular el clonado de genes, la caracterización genética y estructural de patógenos y la consecuente identificación de epitopos y secuencias proteicas que estimulan la respuesta humoral y celular, y la posibilidad de transferir información genética de un organismo a otro no relacionado, permiten "diseñar vacunas" que ofrezcan una solución a algunos de los problemas identificados en el Cuadro 1.

#### III.1 Prevención a la infección en animales: vacunas a ADN

Las vacunas a ADN, llamadas también vacunas de ácidos nucleicos o inmunización genética, consisten en la introducción en el huésped de ADN que contenga la información para la síntesis de proteínas del *patógeno "in vivo"*.

La posibilidad que se pueda obtener una respuesta inmune por inoculación de ADN fue demostrada por el grupo de Stephen Johnston en 1992 (10), al aislar anticuerpos específicos

en ratón contra la hormona de crecimiento humano, luego de la inoculación de plásmidos que contenían genes que codificaban para dicha proteína.

En teoría, representa la aproximación más cercana a la infección natural ya que el uso de vacunas a ADN produce la expresión del antígeno "*in vivo*" y en consecuencia se puede lograr una correcta presentación antigénica de los principales epitopos al sistema inmune, representando una gran ventaja respecto de lo que ocurre con las vacunas inactivadas o a subunidades (11).

Las vacunas a ADN son plásmidos bacterianos con un promotor viral fuerte (p.e. promotor temprano de citomegalovirus humano), el gen que codifica para el/los antígeno/s de interés y secuencias de poliadenilación y terminación de la transcripción (p.e. región 3' no traducida de la hormona de crecimiento bovino). Debido a que la expresión se realiza en células eucarióticas, se le introduce al plásmido bacteriano un intrón (p.e. intrón A de citomegalovirus) para permitir optimizar la expresión de los genes en células de mamíferos. Los plásmidos, se construyen de manera que el origen de replicación no sea funcional en células eucarióticas, para que no se replique en dichas células ni exista la posibilidad de integración al ADN cromosómico del animal (12).

Los plásmidos se multiplican en bacterias (p.e. *E. coli*), se purifican e inyectan en el huésped. Actualmente se utilizan dos métodos de inoculación, por inyección intramuscular, intraperitoneal, intranasal o intradérmica o por métodos biolísticos ("gene-gun" o revólver génico).

Resultados obtenidos hasta el presente, indican que por inoculación de ADN se obtuvo una respuesta inmune efectiva en diferentes especies ani-

males (p.e. bovinos, primates no humanos, ratones, conejos, pollos) contra virus, bacterias y parásitos. En muchos casos, tal como se muestra en el **Cuadro 2**, la respuesta fue protectora frente a diferentes tipos de patógenos de mamíferos.

Como consecuencia de la inoculación de ADN, parte del mismo es internalizado en las células (p.e. musculares, epiteliales, macrófagos) produciéndose la síntesis intracelular de los antígenos, estimulando al sistema inmune de una manera similar a una infección (13).

En el **Cuadro 3**, se resumen las ventajas y desventajas del uso de vacunas a ADN. Hay diversos factores que condicionan el tipo de respuesta inmune que se genere: el método y vía de inoculación utilizado, los niveles de expresión, el tipo de antígeno seleccionado y la cantidad de ADN inoculado. En muchos casos se obtiene una fuerte respuesta humoral, con altos títulos de anticuerpos neutralizantes, consecuencia de la presentación "natural" de los antígenos "*in vivo*" que conservan la estructura de los epitopos conformacionales. De igual manera, se ha demostrado una fuerte respuesta del tipo Th1 y actividad de linfocitos T citotóxicos (Tc) de singular importancia para la eliminación de parásitos intracelulares (14).

Existen controversias sobre el efecto del método de inoculación en la selección del tipo de respuesta humoral o celular. La inyección intramuscular o intradérmica de ADN que codifica para antígenos asociados a células, tiende a generar linfoquinas ( $\gamma$ -IF, IL-2) dependientes de células Th1 y anticuerpos dependientes de complemento. Por otra parte, si el método de inoculación es el revólver génico se liberan preferentemente linfoquinas Th2 y anticuerpos independientes de complemento (15).

Sin embargo, Johnston (16) ha mostrado evidencias que el tipo de respuesta está más relacionada con la cantidad de ADN que se inocula que con el método de inoculación que se utiliza. En promedio, la inoculación intramuscular o intradérmal requiere 100 veces más ADN que el uso de revólver génico, posiblemente debido a la degradación por nucleasas del ADN extracelular respecto a la inoculación directa intracelular cuando se utiliza el revólver génico (17). Para obtener una respuesta humoral se requieren 40 ng de ADN y menos de 1 ng para la respuesta celular, existiendo un efecto dosis-respuesta si los antígenos no son tóxicos para la célula. En experiencias en que se inocularon ratones con cantidades muy bajas de ADN se generó una respuesta del tipo Th2 con producción de inmunoglobulinas del tipo IgG<sub>1</sub> independientemente del método de inoculación (inyección i.m o por revolver génico), al incrementar la cantidad de ADN inoculado, en ambos casos se obtuvo un cambio del isotipo de inmunoglobulinas (IgG<sub>2a</sub>) que indican una respuesta tipo Th1 (16).

Si se compara el tipo de respuesta inmune que se obtiene al vacunar con ADN o con proteínas, se puede concluir que en general, las vacunas a ADN, se caracterizan por producir una respuesta humoral más baja y una respuesta celular mayor que las vacunas proteicas. El menor nivel de anticuerpos generado por la vacunación por ADN puede incrementarse si: i) se prima con ADN y revacuna con proteínas. ii) se introduce mayor cantidad de ADN, debido al demostrado efecto adyuvante del ADN "per se", o iii) se introducen en el plásmido secuencias inmuno estimulantes (p.e. ADN de bacterias, IL-2).

Además del tipo de respuesta inmune resultante de la inmunizaciones con vacunas a ADN, hay dos aspectos

que ameritan los esfuerzos que se están realizando para profundizar las investigaciones en este tema. El primero es la duración de la respuesta humoral: en ratones vacunados con ADN que codifica para proteínas de virus animales y humanos, se detectaron anticuerpos neutralizantes que persistieron durante el período de vida del ratón (12). Posiblemente, las vacunas a ADN provean un reservorio de antígeno intracelular, protegido de la eliminación por anticuerpos, a diferencia de lo que ocurre con las vacunas proteicas. La producción intracelular continua de antígenos estimularía el sistema inmune y explicaría la larga duración de inmunidad (13).

El segundo aspecto, está relacionado con las dificultades actuales para inmunizar animales jóvenes, los cuales debido a la inmunodeficiencia neonatal la inmadurez de su sistema inmune y la presencia de anticuerpos calostrales maternos no producen la respuesta deseada a la vacunación convencional. Resultados preliminares obtenidos por inmunización por el método del cañón génico, muestran una mejor respuesta en ratones jóvenes que en adultos (16). Debido a que las vacunas a ADN producen una fuerte respuesta del tipo Th1, existen muy buenas perspectivas de protección frente a patógenos intracelulares (18).

La vacunación con ADN es un área en pleno desarrollo, cuya potencialidad y eficacia se demostrará en los próximos años, a medida que se investiguen en mayor profundidad los mecanismos relacionados con la inducción de la respuesta inmune. En particular, es necesario tener un mayor grado de conocimientos sobre el tipo y nivel de respuesta inmune en función de: el método y vía de inoculación, la cantidad de ADN a inocular, el tipo de proteína a expresar, el número de vacunaciones a

realizar, el efecto potenciador de diferentes adyuvantes, la factibilidad de inmunización a través de mucosas, etc. y por otra parte los riesgos potenciales del uso de ese tipo de tecnología.

Tales riesgos están relacionados con la posible integración del ADN al genoma del huésped, la posibilidad de inducción de inmunotolerancia o autoinmunidad y la potencial inducción de anticuerpos contra el ADN y, a pesar que las experiencias realizadas hasta el presente no han mostrado efectos indeseables, es necesario profundizar las mismas (19).

### **III.2 Prevención a la infección en vegetales: transformación con ADN.**

Tal como se mencionó precedentemente, la posibilidad de introducir información genética (ADN) en plantas, provenientes de organismos no relacionados fitogenéticamente, abrió nuevos caminos para el control de las enfermedades infecciosas.

Las estrategias utilizadas para el control de las enfermedades infecciosas se fundamentan en la potenciación o activación de los mecanismos naturales de defensa del huésped, debiéndose interpretar los mecanismos de defensa en un sentido amplio, es decir tanto los relacionados con la interacción huésped patógeno como los mecanismos de regulación de la función celular. En lo concerniente a los relacionados con la interacción huésped patógeno, el criterio utilizado es la inhibición de funciones esenciales y específicas del patógeno, que no afecten el normal funcionamiento de la célula huésped.

La transformación de plantas con genes que codifican para la síntesis de proteínas con actividad antibacteriana (p.e. lisozima) o antifúngica (p.e. quitinasas, glucanasas) no ha resultado

en una completa inmunidad, por lo cual actualmente se están utilizando combinaciones de genes o la combinación de esta estrategia con otras. Además, teniendo en cuenta que muchas bacterias y hongos son beneficiosos para las plantas, los genes seleccionados deberían ser específicos para patógenos. Por ello, resulta más atractivo, aunque más complejo por el actual nivel de conocimiento, la transformación con genes que inactiven los factores de patogenicidad, como son las toxinas bacterianas y fúngicas o provocar la respuesta de hipersensibilidad por transformación con plásmidos que contengan genes que induzcan la apoptosis celular y promotores de plantas inducibles por el patógeno (20).

En enfermedades virales, es hasta el presente, donde mayor éxito ha logrado para la obtención de resistencia. Plantas transgénicas con resistencia a virus ya se están comercializando como es el caso de la papa, la calabaza, etc.

La estrategia seguida se basó principalmente en el concepto de "resistencia derivada del parásito" (RDP) introducido por Sanford y Johnston (21) en 1987. Los autores, plantearon una hipótesis por la cual la expresión en plantas de genes específicos del patógeno en exceso o en el momento inadecuado, pueden inhibir la multiplicación del mismo. Este concepto es aplicable para todo tipo de patógenos, pero donde más se utilizó fue en la prevención de enfermedades virales. Para los virus vegetales, los genes seleccionados fueron los de la cápside viral, la replicasa y aquellos que codifican para las proteínas de movimiento.

La expresión de proteínas de la cápside en altos niveles, previene la infección viral al inhibir el proceso de descapsidación y en consecuencia habría menos genoma viral disponible para

su replicación. Sería equivalente a disminuir la carga viral durante el proceso de infección y facilitar su control por parte de las defensas del huésped (22).

Las primeras experiencias realizadas con genes que codifican para la replicasa de los virus fueron realizadas en 1990 por Golembosky y col. (23) quienes demostraron que plantas de tabaco transformadas eran resistentes a la infección por el virus del mosaico del tabaco. Desde entonces, se han utilizado genes que codificaban para fragmentos de la replicasa o replicasas mutadas, en diferentes sistemas virus-huésped (24).

A diferencia de los casos anteriores, el uso de genes que codifican para proteínas de movimiento mutadas, no producen resistencia total, sino demora en la aparición de los síntomas de la infección (25).

A pesar que el mayor número de experiencias realizadas durante la última década en transformación de plantas se basó en el concepto de resistencia derivadas del patógeno, y del éxito obtenido de plantas transformadas con resistencia a virus, el mecanismo por el cual se obtuvo la resistencia no estaba relacionado en la mayor parte de los casos con dicho concepto.

En particular, la falta de correlación dosis-respuesta, es decir plantas transgénicas que expresaban altos niveles de proteínas del patógenos eran menos resistentes que algunas que expresaban bajos niveles de proteínas; o el mayor espectro de protección que superaba en muchos casos el nivel de especificidad de raza del patógeno, son ejemplos de hechos que llevaron a pensar que otros mecanismos de defensa estaban teniendo lugar y que el nivel de acción de dichos mecanismos debían ser pretraduccional. La obtención de plantas resistentes a virus mediante la transformación con ADN que represen-

ta secuencias genómicas del patógeno pero que no tuvieran las señales de traducción (síntesis de proteínas) fue una fuerte evidencia que el mecanismo de resistencia ocurría a nivel pretraduccional. Es más, brotes nuevos de plantas transformadas que perdieron la capacidad de resistencia al virus, eran resistentes y dicha capacidad estaba relacionada con la disminución de los niveles de ARN citoplasmático del transgén (ADN introducido por transformación) y no con el nivel de expresión de las proteínas codificadas por el transgén.

Numerosas investigaciones realizadas durante los últimos tres años, indican que el mecanismo de resistencia observado es a nivel celular (no relacionado con la resistencia sistémica adquirida) y que estaría mediada por los mecanismos de control de la expresión genética frente a la síntesis intracelular de ARNs aberrantes. Existen grandes similitudes entre este tipo de resistencia mediada por ARN y el fenómeno de cosupresión observado en plantas transgénicas, que refuerzan la idea que en ambos procesos intervienen mecanismos comunes de regulación de la expresión génica.

Basados en dichas investigaciones, Prince y Goldbach (26) en 1996, proponen un modelo que se puede resumir de la siguiente manera: a) la transcripción de los transgenes en el núcleo, produce un inaceptable nivel para la célula de ARN del transgen b) se produce la selección de un ARN de determinado sentido (polaridad) por un factor citoplasmático que incluye una polimerasa dependiente de ARN que transcribe cortos ARN antisentido c) estos ARN forman el "core" de ribonucleasas específicas para determinadas secuencias de ARN que degradan secuencias idénticas o complementarias al transgén, resultando en

bajos niveles de ARN del transgén d) mecanismos "feed back" de regulación a nivel nuclear producirían la metilación del transgén, causando mayores alteraciones en la transcripción e incrementando la frecuencia de aparición de secuencias aberrantes de ARN, potenciando el efecto de silenciamiento. e) luego de la entrada del virus a una célula, su ARN genómico, que tiene secuencias comunes con el transgén, es también degradado, siendo el resultado final la resistencia a la infección.

El resultado de las recientes investigaciones sobre este tema permiten extraer algunas conclusiones sobre la resistencia mediada por ARN:

- a) La resistencia no es sobrepasada por el incremento de virus inoculado.
- b) Debido a la especificidad de las secuencias blanco de las ribonucleasas, no hay resistencia frente a virus heterólogos, sin embargo el nivel de resistencia es más amplio (>90% de homología con el gen del virus) que la obtenida por expresión de proteínas, en la cual hasta una mutación puntual puede afectar la resistencia.
- c) Si se utilizan transgenes que no tengan capacidad de traducción, no se produce síntesis de proteínas y en consecuencia se evitan posibles transcapsidaciones o recombinaciones con genes virales.
- d) Debido a la destrucción específica de genomas virales es una tecnología aceptable desde el punto de vista de bioseguridad (26).

#### **IV CONCLUSIONES**

El uso de ADN como "inmunógeno" en animales y vegetales es una herramienta muy promisoriosa para el control de las enfermedades infeccio-

sas. En el caso de animales es necesario que el transgén exprese las proteínas del antígeno y que no haya integración del ADN al cromosoma del huésped, mientras que en plantas no es necesaria la expresión de proteínas y el transgén debe integrarse al cromosoma del huésped de manera que se transmita la información genética a otros individuos.

Tanto en plantas como en animales mediante el uso de esta tecnología se ha obtenido protección frente a diferentes tipos de patógenos. En vegetales ya hay resultados concretos de su eficacia, demostrados por la comercialización de plantas transgénicas con resistencia a virus. En mamíferos, se logró también protección en animales de laboratorio por vacunación con ADN, y es de destacar el éxito obtenido con respecto a agentes etiológicos de enfermedades humanas que hasta el presente no se había podido inducir una respuesta inmune efectiva por el uso de métodos convencionales de vacunación como la hepatitis B crónica, la hepatitis C y Ebola (27).

Por último, en este trabajo se han señalado mecanismos de defensa a la infección, equivalentes y en muchos casos semejantes en plantas y animales. Es importante destacar, que éste tema requiere un mayor nivel de análisis ya que si se incrementa la interacción entre fitopatólogos y patólogos animales pueden surgir nuevas estrategias para combatir las enfermedades en animales y vegetales.

Dicha interacción constituye la base de los requerimientos actuales de trabajo interdisciplinario para dar una respuesta global a los desafíos que tiene el Hombre en su lucha constante para asegurar su fuente de alimentos.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Swaminathan, M.S. 1995. Population, Environment and Food Security. Issues in Agriculture, N° 7 CGIAR, Washington D.C.
- (2) Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*: 276, 726-33.
- (3) Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell*: 6, 1191-1192.
- (4) Dixon, R.A., Harrison, M. and Lamb, C. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.*: 332, 479-501.
- (5) Flor, H.H. 1971. Current status of the gene for gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.*: 9, 275-296.
- (6) De Wit, P. 1997. Pathogen and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci.*: 2, 452-8.
- (7) Vaux, D.L. 1993 Towards an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*:90, 786-789.
- (8) Dickman, M.B., Herang, C., Jones, C. and Gilchrist, D. 1995. Apoptotic cell death and G1 arrest in plant and animal cells induced by fumosin. *Fungal Genetic Newsletter*: 42 A, 27.
- (9) Heinzl, F. 1995. Th1 and Th2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. *Curr. Opin. Infect. Dis.*: 8, 151-5.
- (10) Tang, D., De Vit, M. and Johnston S. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*: 356, 152-4.
- (11) Aguado, T., Bazin, H., Rabinovich, R., Smith, H. and Vogel, F. 1997. International meeting on nucleic acid vaccines for the prevention of infectious diseases. *Vaccine*: 15 vii-vii.
- (12) Donnelly, J., Ulmer, J., Sliver, J. and Liu, M. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.*: 15, 617-48.
- (13) Tighe, H. Corr, M., Roman, M. and Raz, E. 1998. Gene vaccination: Plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunology Today*: 2, 89-97.
- (14) Fynan, E., Webster, R., Fuller, D., Haynes, J., Santoro, J. and Robinson, H. 1993. DNA vaccines - protective immunizations by parenteral, mucosal and genegun inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*: 90, 478-82.
- (15) Robinson, H. 1997. Nucleic acid vaccines an overview. *Vaccine*: 15, 785-7.
- (16) Barry, M. and Johnston, S. 1997. Biologicals of genetic immunization. *Vaccine*: 15, 788-791.

- (17) Levy, M., Barron, L., Meyer, K. and Skoza, F. 1996. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.* 3, 201-11.
- (18) Siegrist, C. 1997. Potential advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. *Vaccine*: 15, 798-800.
- (19) Smith, H., Goldenthal, K. Vogel, F., Rabinovich, R. and Aguado, T. 1997 Meeting report. Workshop on the control and standardization of nucleic acid vaccines. *Vaccine*: 15, 931-3.
- (20) Manners, J. and Dickman, M. 1997. Resistance to fungal pathogens. In *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. Ed. B. McKersie and D. Brown. CAB. International. p. 259-290.
- (21) Sanford, J. and Johnston, S. 1985. The concept of parasite-derived resistance. Derived resistance genes from the parasites. *J. Theor. Biol.*: 113, 395-405.
- (22) Wilson, T.: 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen - derived - resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*: 90, 3134-41.
- (23) Golembosky, D., Lomonosoff, G. and Zaitlin, M. 1990. Plants Transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*: 87, 6311-5.
- (24) Baulcombe, D. 1994. Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends, Microbiol.*: 2, 60-3.
- (25) Beck, D., Vandoilewerd, C., Lough, T., Balmori, E., Voot, D., Andersen, M., O'Brien, I. and Forster R. 1994. Disruption of virus movement confers broad spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*: 9, 10310-4.
- (26) Prince, M. and Goldbach, R., 1996. RNA - mediated resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.*: 141, 2259-76.
- (27) Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z., Zaki, S., Nabel, E., Nichol, S. and Nabel, G. 1988. Immunization for Ebola virus infection. *Nature Med.*: 4, 37-42.

## Cuadro 1

### Ventajas y desventajas de diferentes tipos de vacunas.

Tipo de Vacunas	Ventajas	Desventajas
<p><b>Inactivadas</b></p>	<p>Inocuidad. Buenos niveles de protección principalmente en revacunaciones. Experiencia en su producción y en sus efectos.</p>	<p>Altos costos de producción. Corta duración de inmunidad. Respuesta inmune principalmente de tipo humoral. Necesidad de uso de adyuvantes. Problemas de bioseguridad por manejo de patógenos en plantas de producción. Posibilidad de escapes de los laboratorios. Posibilidad de inadecuada inactivación. Inestables a la temperatura.</p>
<p><b>Atenuadas</b></p>	<p>Muy buena cobertura. Bajo costo. Formulación sencilla (sin adyuvantes). Larga duración de inmunidad (no requiere revacunación). Activación de respuesta humoral y celular.</p>	<p>Posibilidad de reversión de cepas atenuadas a virulentas. Inestables a la temperatura. Posible patogenicidad en individuos inmunocomprometidos. Dificultan la diferenciación de animales vacunados de infectados. Problemas de bioseguridad en los laboratorios de producción.</p>
<p><b>Subunidades</b> [síntesis química o biosíntesis (expresión en bacterias, levaduras, plantas, células de insecto, etc.)]</p>	<p>Composición definida. Estables e temperatura. No utiliza agentes patógenos. No se necesita condiciones de bioseguridad.</p>	<p>Bajos niveles de protección. Respuesta muy específica. Necesidad de adyuvante. Corta duración de inmunidad. Necesidad de revacunación. Selección de variantes. Principalmente respuesta humoral.</p>
<p><b>Quimeras</b> (virus o bacterias)</p>	<p>Facilidad de producción. Respuesta humoral y celular. Permite diferenciar animales vacunados de infectados.</p>	<p>Baja especificidad de respuesta. Facilita la selección de variantes. Sensibles a la temperatura</p>

## Cuadro 2

### Protección conferida por vacunas a ADN.

<b>Virus</b>	Influenza Herpesvirus bovino Rabia  Rotavirus	Fynan et al. 1993 (PNAS: 90, 478-82) Cox et al. 1993 J. Virol.:67, 5664-7 Xiang et al. Virology 199, 132-40 Ray et al. 1997 Vaccine: 15, 892-5 Lodmell, R. et al. 1998 Vaccine: 16, 115-118 Chen, S. et al. 1997 Vaccine: 15, 899-902
<b>Bacterias/toxinas</b>	Mycobacterium tuberculosis Clostridium tetani (toxina tetánica)	Lozes, E. 1997 Vaccine: 15. 830-3 Anderson, R. et al, 1997 vaccine: 15, 827-9
<b>Parásitos</b>	Leishmania major Plasmodium yoelii	Xu, D. et al. 1995 Immunology: 84, 173-6 Sedegah, M. et al. 1994 PNAS: 91, 9866-70

### Cuadro 3

#### Ventajas del uso de ADN como inmunógeno respecto del uso de proteínas en vacunas convencionales.

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fácil manejo y bajo costo de producción.</li><li>• Estables a la temperatura.</li><li>• No requieren la manipulación de patógenos.</li><li>• Proveen una prolongada expresión del antígeno que estimula continuamente el sistema inmune.</li><li>• Producen respuestas inmunes de tipo humoral y celular.</li><li>• Son eficientes en sistemas inmunes inmaduros no es interferido por anticuerpos calostrales.</li><li>• Cuando se incluye ADN que codifica para citoquinas o moléculas inmunostimulantes se aumenta el nivel de la respuesta y se puede modular al tipo de respuesta inmune.</li><li>• Posibilidad de utilizar mezclas de ADN para diferentes patógenos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Su nivel de eficacia no es igual para los diferentes tipos de patógenos.</li><li>• Aún no se estudió si pueden establecer tolerancia inmunológica.</li><li>• Faltarían más estudios sobre la posible integración al cromosoma del huésped.</li><li>• Sólo hay resultados experimentales en animales de laboratorio.</li><li>• Sólo se han probado con algunos patógenos animales.</li><li>• No está suficientemente esclarecido el mecanismo de acción.</li></ul>