

Tesis de Posgrado

Mecanismos involucrados en la duración de la respuesta inmune humoral al virus de la fiebre aftosa

Wigdorovitz, Andrés

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wigdorovitz, Andrés. (1996). Mecanismos involucrados en la duración de la respuesta inmune humoral al virus de la fiebre aftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2844_Wigdorovitz.pdf

Cita tipo Chicago:

Wigdorovitz, Andrés. "Mecanismos involucrados en la duración de la respuesta inmune humoral al virus de la fiebre aftosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2844_Wigdorovitz.pdf

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DURACION DE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA**


Tesista: ANDRES WIGDOROVITZ

**Director de Tesis: Dr Manuel Victor Borca
Codirector de Tesis: Dra Ana María Sadir**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Virología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias.
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Castelar**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

52



A mis viejos, a los que quiero muchísimo
A mis hermanos Alina y Ariel (la alegría del hogar) con quienes tengo una gran
amistad
A Adu, mi amor
A la memoria de la Bobe, con quien me hubiera gustado compartir este momento

AGRADECIMIENTOS

Todos sabemos que hacer una tesis no es fácil, y sobre todo, que requiere muuuucho, muuuucho tiempo, perseverancia, sudor y dolores de cabeza. Sin embargo la sensación que se siente cuando uno está por anillar es genial, una mezcla de cosquilleo en la panza, alegría satisfacción y sobre todo orgullo, mucho orgullo; y son estas sensaciones las que quiero compartir con toda la gente que estuvo a mi lado.

A toda mi familia, por haber estado a mi lado incondicionalmente.

A mi mamá por ser una perfecta "Idishe mame".

Al Dr Manuel Borca por contagiarme su optimismo y confianza, por su valiosa dirección, apoyo y conocimiento científico que permitieron la realización de este trabajo y sobre todo por su inagotable paciencia en el momento de corregir una y otra vez esta tesis.

A la Dra Ana Sadir, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su grupo, por su invaluable apoyo y constante estímulo. Y sobre todo por saber que siempre puedo contar con ella

Al Dr. Alejandro Schudel, que siempre ha estado a mi disposición.

A todos mis compañeros del Instituto de Virología, sin cuya ayuda no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A mis compañeros de grupo: Mariano, Antonio, Alejandra, Mariana, María José y Abel por todo lo que me ayudaron y por los buenos y no tan buenos momentos compartidos.

A la Petizzza, por haberme ayudado, alentado y aguantado en todos estos años. Mil gracias.

A los chicos Gaby (el tano), Vanina, Martín, Gaby y Débora por su amistad, por todos los momentos compartidos y por compartir

A Gusty, por su amistad desde Platero.

A los hijos de mis amigos (Lucía, Alina y Tomy) que nacieron antes que este trabajo de tesis.

Al **AUDACIEUX** (mi pasión) por los infinitos fines de semana que pasamos juntos.

RESUMEN

La fiebre aftosa constituye un serio problema sanitario que afecta a las especies biunguladas que genera severas consecuencias económicas a nivel mundial. Las vacunas formuladas con virus inactivado como antígeno (Ag) inducen respuestas de anticuerpos seroneutralizantes (AcN) de corta duración y es necesaria la revacunación periódica

La infección experimental en ratón adulto genera una continua e intensa respuesta de AcN tal como sucede en el huésped natural. Esta prolongada síntesis de Acs anti-VFA hace del modelo murino un excelente sistema para el estudio de los mecanismos involucrados en una prolongada respuesta humoral.

Aunque este fenómeno es conocido desde hace tiempo, las bases inmunológicas responsables de la prolongada inmunidad inducida luego de la infección se encuentran aún sin dilucidar.

Con la intención de comprender la causa de la respuesta inmune humoral al VFA, la primera parte de este trabajo de tesis estuvo dirigida a aclarar si el mantenimiento de los niveles de Acs puede ser explicado por un fenómeno de infección persistente del individuo, o mediante una persistencia antigénica mediada por células presentadoras de antígeno (CPA). La segunda parte del trabajo de tesis fue dirigida a estudiar los mecanismos de acción de dos efectivos inmunomoduladores (Avridine -AVR- y la pared de *Mycobacterium* -PCM) en la inducción de una prolongada respuesta humoral.

Es importante enfatizar que los ensayos de transferencia utilizados en este trabajo permitieron acotar el sistema a los esplenocitos transferidos, debido a que estas células resultaron suficientes para inducir una prolongada respuesta humoral en los animales receptores normales (Tabla 1).

La hipótesis de la existencia de una infección persistente fue descartada mediante la utilización de varios métodos, en especial la falta de detección del genoma utilizando un ensayo de PCR cuya sensibilidad es de 10^{-3} DIRL 50%. (Tabla 3 A y B). Además, el hecho de que haya sido posible obtener resultados similares a través de la inmunización de los animales dadores con antígenos inertes corroboró que la replicación viral definitivamente no es una condición indispensable para que se induzca una prolongada respuesta humoral (figura 6B).

La transferencia de esplenocitos irradiados provenientes de animales infectados a animales receptores presensibilizados y negativizados (inmunizados con bajas dosis de virus inactivado) permitió la detección funcional de CPA específicas para el virus aftoso.

La inhibición de la presentación antigénica (PA) *in vitro*, los ensayos de inhibición de la PA *in vivo* y el establecimiento de una correlación entre la capacidad de presentar el Ag y el título de Acs del animal dador corroboraron que, en el modelo utilizado, la presencia de CPA es el mecanismo que media la prolongada respuesta humoral anti-VFA

que se observa en animales que fueron infectados. Dos datos experimentales merecen ser destacados: (i) Las células B son suficientes para la producción del fenómeno (figura 16B). (ii) Las CPA fueron capaces de permanecer en el animal dador por lo menos 365 días después de la infección (figura 15 B)

Conociendo que la presencia de CPA es el mecanismo que media la prolongada respuesta humoral anti-VFA en los animales infectados, se analizó: la capacidad de inducir CPA en los animales inmunizados con diferentes formulaciones vacunales.

Los ensayos realizados demostraron que tanto las CPA que provenían de animales infectados así como las obtenidas de ratones que fueron inmunizados con las diferentes formulaciones fueron capaces de inducir Acs detectables por ELISA. Sin embargo, solamente los esplenocitos de animales infectados o inmunizados con la vacuna inmunomodulada con AVR indujeron Acs de tipo neutralizante en los ratones receptores presensibilizados (figura 20 B).

La utilización del ensayo de doble transferencia (figura 22) demostró que la presencia de Ag circulante en el animal dador no es necesaria para el mantenimiento de las CPA (figura 24). Estos resultados son coincidentes con la continua presencia de CPA en los animales infectados (hasta los 365 días post-infección) en los cuales no es posible encontrar antígeno viral ni partículas infecciosas.

Se utilizó un sistema de PA donde el antígeno a ser considerado es mucho más simple en términos de cantidad de determinantes antigénicos para intentar explicar la diferencia observada entre las respuestas inducidas por las distintas vacunas utilizadas.

Los esplenocitos extraídos de los animales inmunizados con dosis crecientes correspondiente a la secuencia 135-160 de VP1 del VFA O1C (P1) indujeron respuestas correlativamente incrementadas de Acs detectables primero, por ELISA y, posteriormente, por SN. Estos resultados apuntalan la hipótesis que sostiene que las diferencias entre la inducción de anticuerpos neutralizantes y aquellos detectados solamente por ELISA puede ser meramente debida a la masa antigénica presentada. Posteriormente, se analizó el efecto de los dos inmunomoduladores en un posible procesamiento diferencial de las distintas porciones del P1. Los resultados demostraron que, en efecto, estas diferencias existen, ya que los patrones de reactividad demostrados por los sueros de los animales infectados e inmunizados con AVR resultaron similares y cualitativamente diferentes a aquellos presentados por los sueros de los animales inmunizados con PCM o el vehículo oleoso *per se* (figura 25). Esto sustentaría que adicionalmente a un fenómeno de tipo cuantitativo, también existe un factor cualitativo como explicación a las diferencias encontradas en la respuesta humoral inducida en los animales receptores de células provenientes de dadores inmunizados con diferentes inmunomoduladores. La estrecha correlación entre la presencia y actividad de las CPA específicas para VFA, y los títulos de Acs observados en los animales que fueron

estimulados antigenicamente de la forma mas diversa con (infectados experimentalmente o inmunizados con virus inactivo bajo muy diferentes condiciones), poderosamente sugiere que el mecanismo involucrado en el mantenimiento de la respuesta inmune es la presencia de CPA reestimulando en forma permanente la produccion de Acs anti-VFA. Estos resultados son de importancia para el diseño y desarrollo de nuevas vacunas en las cuales se deberia principalmente focalizar la atención en metodologias que estimulen la induccion y un eficaz mantenimiento de CPA especificas para VFA en los individuos vacunados.

INDICE

I. INTRODUCCION

I.1	La Fiebre Aftosa	1
I.1.1	Historia	1
I.1.2	Definición	2
I.1.3	Importancia económica	2
I.1.4	Síntomas clínicos producidos por el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA), su transmisión	3
I.1.5	Infección persistente	3
I.1.6	Distribución geográfica del VFA y medidas de control	4
I.2	El virus de la Fiebre Aftosa	6
I.2.1	Características generales de los picornavirus	6
I.2.2	Características generales del VFA	7
I.2.2.1	Estructura de la cápside	8
I.2.2.2	Genoma, PoliA, VPG, PoliC y regiones no codificantes	10
I.2.3	Ciclo de replicación del VFA	12
I.2.3.1	Adsorción	12
I.2.3.2	Penetración y desnudamiento	13
I.2.3.3	Mecanismo de replicación del ARN genómico	13
I.2.3.4	Síntesis de proteínas virales y formación del virión maduro	13
I.2.3.5	Empaquetamiento del ARN viral	14
I.2.3.6	Liberación del virión	15
I.2.4	Características antigénicas del VFA	15
I.3	Respuesta inmune durante la infección viral	17
I.3.1	Respuesta inmune a Picornavirus	18
I.3.2	Respuesta inmune frente al VFA	18
I.3.2.1	Respuesta inmune en ratones al VFA	19
I.4	Vacunas contra el VFA	20
I.4.1	Vacunas en uso	21
I.4.2	Vacunas experimentales	21
I.5	Adyuvantes	22
I.5.1	Acción de los adyuvantes sobre el hospedador	22

I.5.2	Acción de los adyuvantes sobre el antígeno	23
I.5.3	Vacunas anti-VFA formuladas con adyuvantes	24
I.5.4	Adyuvantes utilizados en este trabajo	24
I.6	Respuesta inmune humoral: Mecanismos involucrados en la duración de la respuesta	25
I.6.1	Persistencia del antígeno	27
I.6.2	Presencia de células presentadoras de antígeno	28
I.6.2.1	Presentación del antígeno por macrófagos	29
I.6.2.2	Presentación del antígeno por células dendríticas	30
I.6.2.3	Presentación del antígeno por células B	30
I.7	Importancia de este trabajo	31
II	OBJETIVOS	33
III	MATERIALES Y METODOS	34
III.1	Ratones	34
III.2	Virus	34
III.2.1	Obtención de virus	34
III.2.2	Inactivación de virus	34
III.2.3	Purificación de virus	35
III.3	Anticuerpos monoclonales utilizados	35
	Obtención a partir de:	
III.3.1	sobrenadante de cultivo	35
III.3.2	líquido ascítico de ratón	36
III.4	Obtención de sueros policlonales de conejo anti-VFA O1 Campos y ovoalbúmina (OVA)	36
III.5	Purificación de Acs mediante cromatografía en columnas	36
III.5.1	Cromatografía de afinidad (Proteína A o G)	36
III.5.2	Cromatografía de filtración (Sephacryl 300)	37

III.6	Marcación de Acs con isotiocianato de fluoresceína	37
III.7	Péptidos sintéticos	37
III.8	Formulación de las diferentes vacunas	38
III.8.1	Vacuna anti-VFA	38
III.8.2	Vacuna anti-OVA	38
III.8.3	Vacuna anti-péptido 135-160 de VP1 O1C	38
III.8.4	Vacuna anti-VFA formulada con Avridine (AVR) o pared de <u>Mycobacterium</u> (PCM)	38
III.9	Inmunización	39
III.9.1	Con virus infeccioso	39
III.9.2	Con las distintas vacunas	39
III.10	Extracción de sangre, obtención de plasma y suero	39
III.11	Titulaciones	39
III.11.1	Titulación de virus	39
III.11.2	Titulación de Acs neutralizantes (AcN)	39
III.11.3	Titulación de Acs anti-virus mediante un ELISA indirecto	40
III.12	Determinación de la persistencia viral	40
III.12.1	Cocultivo de esplenocitos con células de tiroides bovina	41
III.12.2	Inoculación de macerado de células esplénicas a ratones lactantes	41
III.12.3	Detección de genoma viral en células esplénicas murinas mediante el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
III.13	Preparación de suspensiones celulares	41
III.14	Caracterización de las poblaciones celulares	42
III.15	Preparación de las Células Presentadoras de antígeno (CPA)	42
III.15.1	Fijación de los esplenocitos con Glutaraldehído (GA)	42
III.15.2	Inactivación de los esplenocitos por irradiación	43

III.16	Ensayos de transferencia celular	43
III.16.1	Transferencia de esplenocitos de animales infectados o vacunados a receptores normales o irradiados	43
III.16.2	Transferencia de CPA de animales infectados o vacunados a receptores normales o sensibilizados previamente con el virus inactivo	43
III.16.3	Dobles transferencias	44
III.16.3.1	Transferencia de esplenocitos de animales infectados o vacunados a receptores normales y las CPA de estos a receptores presensibilizados	44
III.17	Ensayos de producción e inhibición de Acs <i>in vitro</i>	44
III.18	Ensayos de inhibición de la Presentación Antigénica (PA) <i>in vivo</i>	45
IV	RESULTADOS	
IV.1	Evaluación <i>in vivo</i> de las bases celulares de la prolongada respuesta inmune humoral en animales experimentales infectados o inmunizados con virus inactivo (VI)	46
IV.1.1	Evaluación del (o los) órgano(s) involucrado(s) en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune humoral inducida durante la infección con VFA	46
IV.1.2	Caracterización de las células de bazo utilizadas en los experimentos de transferencia de células esplénicas	48
IV.1.3	Evaluación del número óptimo de esplenocitos provenientes de dadores infectados necesarios para inducir una respuesta humoral en un receptor normal	48
IV.1.4	Efecto de la antigüedad de la respuesta inmune en la capacidad de esplenocitos provenientes de dadores infectados en inducir Acs en receptores normales	49
IV.1.5	Evaluación de la capacidad de dadores inmunizados con diferentes vacunas en la inducción de una respuesta humoral en receptores normales	50
IV.1.5.1	Transferencia de esplenocitos provenientes de dadores inmunizados con distintas dosis de virus inactivado	50

IV.1.5.2	Transferencia de esplenocitos de dadores inmunizados con vacunas formuladas con diferentes inmunomoduladores	52
IV.2	Identificación de los tipos celulares involucrados en la transferencia de la respuesta humoral en dadores infectados	54
IV.2.1	Papel de las células plasmática en la transferencia de la respuesta humoral	55
IV.3	Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida en ensayos de transferencia de esplenocitos utilizando ratones con diferentes haplotipos	56
IV.4	Evaluación del papel del sistema inmune de los animales receptores en la respuesta humoral inducida post transferencia	58
IV.5	Estudio de la persistencia viral como posible causa de la prolongada inducción de la respuesta inmune humoral en los animales receptores	59
IV.6	Detección de la presencia de genoma viral en los esplenocitos utilizados en las transferencias	60
IV.7	Evaluación del papel de la Presentación Antigénica en la inducción y mantenimiento de la respuesta humoral en animales infectados	62
IV.7.1	Detección de células presentadoras de antígeno específicas para el VFA en el bazo de animales infectados	62
IV.7.2	Habilidad de las células B como células presentadoras de antígeno	68
IV.7.3	Papel de las células T en los ensayos de PA	70
IV.8	Correlación entre el título de Acs anti-VFA y su capacidad de presentar el antígeno en los animales dadores inmunizados con virus inactivo	71
IV.8.1	Evaluación del papel de la masa viral en la Presentación Antigénica	71
IV.8.2	Cinética de la presencia de CPA en dadores inmunizados con virus inactivo	72

IV.9	Identificación de las moléculas involucradas en el fenómeno de Presentación Antigénica	73
IV.9.1	Inhibición <i>in vitro</i>	73
IV.9.2	Inhibición <i>in vivo</i>	75
IV.10	Efecto de Avridine y pared de <u>Mycobacterium</u> en la presentación antigénica	75
IV.10.1	Habilidad como CPA de las células B provenientes de animales vacunados	77
VI.10.2	Influencia del antígeno circulante en la Presentación Antigénica en animales inmunizados con vacunas inmunomoduladas	78
IV.10.3	La secuencia 135-160 de VP1 es presentada eficientemente en animales infectados o inmunizados con distintos inmunomoduladores	83
IV.11	Evaluación de la capacidad inmunogénica del péptido 135-160	85
IV.11.1	Transferencia de esplenocitos de animales inmunizados con el péptido 135-160 a receptores normales	85
IV.11.2	Determinación de CPA en animales vacunados con el péptido 135-160	87
V	DISCUSION	88
VI	CONCLUSIONES	97
VII	BIBLIOGRAFIA	98

ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo Monoclonal
AcN	Acs Neutralizantes
Ac	Anticuerpo
Acs	Anticuerpos
AFI	Adyuvante de Freund incompleto
AG	Antígeno
AVR	Avridine
BB	Buffer de bloqueo
BEI	Bromuro de etilenimina
BHK-21	Línea celular de Hamster bebé
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
DLRL 50%	Dosis Letal ratón lactante 50%
d.p.i.	Días post infección
d.p.t.	Días post transferencia
d.p.v.	Días post vacunación
FA	Fiebre Aftosa
GA	Glutaraldehído
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferón
ISN	Indice Seroneutralizante
OVA	Ovoalbúmina
PA	Presentación Antigénica
PAA	PBS, Albúmina bovina, Azida
PBST	PBS-Tween
PCM	Pared de <u>Mycobacterium</u>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SFB	Suero Fetal Bovino
SN	Seroneutralización
VFA	Virus de la Fiebre Aftosa
VI	Virus inactivo purificado



INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

I.1. LA FIEBRE AFTOSA.

I.1.1. Historia

La fiebre aftosa (FA) ha sido reconocida por alrededor de cuatro siglos. Fracastorius en 1514 fue el primero en reportar un brote de la enfermedad en bovinos (Fracastorius, 1546). La descripción que hace de los animales afectados (anorexia, vesículas en lengua que luego también aparecen en las pezuñas y la recuperación de los animales enfermos) tiene una asombrosa similitud con aquellos observados en la actualidad (Bachrach, 1968). Sin embargo, no fue hasta 1897 cuando se demostró que la enfermedad era causada por un agente filtrable mucho más pequeño que otros microorganismos transmisores de enfermedades (Loeffler and Fosh, 1897). En realidad, el virus de la fiebre aftosa (VFA) fue el primer virus animal reconocido como tal. Loeffler y Fosh en sus experimentos con bovinos notaron la rápida replicación viral en el animal enfermo y aplicando el método de dilución límite, titularon el virus presente en tejido infectado. También realizaron ensayos de neutralización con suero de animales convalecientes.

Wadman y Pape fueron los primeros en reproducir la enfermedad en cobayos inoculados en la almohadilla plantar (Wadman and Pape, 1921).

En Europa la investigación fue focalizada a la solución de problemas en el campo ya que la enfermedad se diseminaba rápidamente. Brotes particularmente severos en el Reino Unido llevaron a la apertura de institutos nacionales de investigación en toda Europa: Insel Reims en Alemania (1909), Pirbright en el Reino Unido (1924) y Lindholm en Dinamarca (1925), así como la dedicación de institutos veterinarios ya existentes como en Alfort, Francia y en Brescia, Italia (Brooksby, 1982). En cuanto a la situación en el resto del mundo, el primer registro de la enfermedad en América del Sur data de 1871, apareciendo en Argentina primero y luego en Brasil, Chile y Uruguay tras la importación de bovinos desde Europa durante el amplio brote surgido allí en 1870. En 1910 se describió la presencia de aftosa por primera vez en Perú, Bolivia y Paraguay, mientras que en Colombia y Venezuela se describió en 1950. La ocurrencia en Africa y Asia está menos documentada, pero es probable que surgiera del transporte de animales infectados desde Europa, aunque los serotipos son diferentes a los "clásicos" europeos (Brown, 1986).

A pesar de ser una enfermedad conocida por más de cuatro siglos, cuyo agente causal fue descubierto hace casi cien años, y aún cuando los medios para el crecimiento del virus en cantidades suficientes para la producción de vacunas a gran escala están

disponibles desde 1950, la enfermedad aún está presente en muchos países del mundo; lo que continúa siendo una grave amenaza para aquellas regiones libres de la enfermedad.

I.1.2. Definición

La FA es una enfermedad aguda, febril y altamente contagiosa que afecta principalmente a animales de pezuña hundida (Bachrach, 1968; Pereira, 1981; Sangar, 1979). Durante el transcurso de la misma se forman vesículas y erosiones características en el revestimiento epitelial de las mucosas del aparato digestivo alto, en el surco y rodete de las uñas y en otros lugares desprovistos de pelo .

I.1.3 Importancia económica

La FA es una de las enfermedades del ganado doméstico que mayores daños económicos causa en el mundo. La mortalidad debida al VFA, con excepción de animales jóvenes, es usualmente insignificante (Pereira, 1981). Sin embargo el alto grado de morbilidad y debilitación, la pérdida de productividad y las lesiones asociadas a infecciones secundarias hacen de la FA un problema importante para los productores ganaderos e industrias relacionadas (Morgan et al., 1980); además, las restricciones que esta enfermedad acarrea en los mercados de exportación de animales y de sus productos origina grandes pérdidas económicas (Callis et. al., 1968), siendo también importante el costo de la implementación de medidas de control y erradicación.

Las lesiones características de la FA en la boca y lengua (vesículas) son las causales de la reducción en la alimentación, mientras que las lesiones en los espacios interdigitales y en el rodete coronario de las patas provocan la casi total inmovilidad de los animales (Cottral et al., 1975). Como consecuencia de estos procesos, el rendimiento económico de los animales enfermos puede disminuir hasta en un 25% (SENASA, 1992).

I.1.4. Síntomas clínicos producidos por el VFA, su transmisión

La FA tiene la reputación de ser una de las enfermedades más temidas del ganado doméstico, principalmente por su amplia distribución geográfica y por ser altamente contagiosa.

El VFA es el agente causal de la FA, enfermedad que afecta particularmente al ganado porcino, bovino, ovino y caprino (Bachrach, 1968; Sangar, 1979; Pereira, 1981). Se considera que el ganado bovino actúa como el principal diseminador de la enfermedad, que el ganado ovino cumple un rol importante en su mantenimiento (Sellers

and Parker, 1969) mientras que el porcino se desempeña como hospedador amplificador (Sellers, 1971).

El virus se transmite entre los animales por diversos mecanismos, por ejemplo por contacto directo, especialmente durante la fase febril temprana cuando el virus se encuentra en la mayoría de los órganos, secreciones y excreciones (Burrows, 1968, Cottral et al., 1968). Asimismo, los pájaros y el viento han sido implicados en el transporte del virus por largas distancias en Europa (Shahan, 1962) y también se ha informado sobre la capacidad potencial de contagio de la enfermedad por virus presente en el aire (Sellers, 1971).

El virus penetra por vía respiratoria o a través de los epitelios de boca y nariz, luego de un corto período de incubación (1 a 4 días) se desarrollan aftas primarias en la zona de entrada. Posteriormente, el virus invade el torrente sanguíneo dando lugar a una viremia y fiebre acompañadas de aftas secundarias, acentuadas en pezuñas, lengua y paladar. En animales jóvenes el miocardio puede verse afectado y en algunos casos provoca su muerte (Bachrach, 1968). Los Acs Neutralizantes (AcN) circulantes aparecen luego de la infección mientras que el virus desaparece del torrente sanguíneo, pero no necesariamente de los tejidos.

I.1.5. Infección persistente

Una característica del VFA es que puede dar lugar a infecciones inaparentes. Este estado se reconoce por el aislamiento del virus en cultivos celulares a partir de muestras del fluido esófago-faríngeo por largos períodos (Burrows, 1966), así como por la prevalencia de anticuerpos (Acs) contra antígenos (Ags) asociados a infección (McVicar and Suttmoller, 1970). De modo que, transcurrida la fase aguda de infección, los animales pueden convertirse también en portadores o "carriers" del VFA, aislándose virus de las secreciones esófago-faríngeas por largos períodos de tiempo (Auge de Mello et al., 1970; Gebauer et al., 1988; Rossi et al., 1988).

La duración del estado portador varía según los autores y parecería depender del tipo viral utilizado en la infección (Van Bekkum et. al., 1959; Suttmoller et. al., 1965; Salt et. al., 1993); además se ha sugerido que bajos niveles de Acs específicos podrían colaborar con la aparición de portadores. Estos niveles de Acs circulantes que previenen la enfermedad, aparentemente no previenen el establecimiento del virus en el área faríngea (Suttmoller and Mc Vicar, 1976).

Burrows y colaboradores determinaron que la persistencia es de 15 meses en bovinos y de 4 meses en ovinos (Burrows et.al., 1968). Sadir y colaboradores (Sadir et. al., 1988) detectaron virus infeccioso en líquido esofago-faríngeo de bovinos hasta los 3 meses post-infección, luego del tratamiento del material extraído con triclorotrifluoroetano para

disociar complejos inmunes. Sin embargo, en estos animales, utilizando una sonda molecular se detectó ARN viral hasta los 560 días post-infección (d.p.i.) (Rossi et al., 1988).

Recientemente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido reportada para la detección de genoma del VFA en tejidos y líquido esófago-faríngeo (Brown et al., 1992; House and Mayer, 1993; Prato Murphy et al., 1995) lo que ha aumentado sensiblemente el poder de detección de los animales "carriers".

Aunque el rol epidemiológico de los animales "carriers" no ha sido totalmente aclarado, se ha postulado que ellos pueden estar involucrados en los cambios antigénicos del virus llevando a la aparición de nuevas variantes virales en el campo. En animales infectados persistentemente con VFA C3, por ejemplo, se detectaron variaciones en la secuencia nucleotídica del ARN viral que se correlacionaron con cambios de antigenicidad detectables por AcM (Gebauer et al., 1988). Estos cambios adjudicados a la presión selectiva del sistema inmune del hospedador portador y la alta tasa de mutación del VFA (Pringle, 1964), podrían ser los causantes de la aparición de nuevos subtipos antigénicos en la naturaleza (Fagg and Hyslop, 1966).

1.1.6. Distribución geográfica del VFA y medidas de control

La FA representa una enfermedad de amplia distribución geográfica, siendo enzoótica en todos los continentes con excepción de Australia, Nueva Zelanda, Japón, Islas Británicas y el hemisferio oeste desde Panamá hacia el norte (Morgan et al. 1984). En el continente americano los Estados Unidos, países de Centroamérica e Islas del Caribe así como Chile, Patagonia Argentina (al sur del paralelo 42), región norte del Chocó en Colombia, Guayana Francesa, Guyana y Surinam en América del Sur se encuentran libres de la enfermedad. Cabe mencionar la situación epidemiológica del Uruguay en el que desde Julio de 1990, no se ha registrado aparición de la enfermedad por lo que ha sido declarado país libre de FA con vacunación (informe OIE, 1993). La mayor incidencia de FA en América del Sur en el año 1992 ocurrió en Colombia, Brasil y Argentina (PANFTOSA, 1993).

En los países de la Comunidad Económica Europea se suspendió la vacunación anti-VFA en junio de 1991, luego del éxito alcanzado en el control de la enfermedad a través de regulares y continuas vacunaciones. Cabe señalar que en 1993, sin embargo, se registró un brote en Italia (informe OIE, 1993) y a fines de 1994 otro en Grecia (Anuario de Sanidad Animal 1994).

A través de los años, los brotes de FA en estas áreas libres de la enfermedad han sido erradicados por medio del rifle sanitario con la consecuente matanza de los animales infectados y aquellos susceptibles a ser infectados (Cottral, 1975). Aún cuando estos

procedimientos son muy costosos, los perjuicios que acarrea la FA endémica justifican tal inversión (McCauley et al., 1977).

En la mayoría de los países en los cuales la enfermedad es enzoótica o que están expuestos repetidamente a contaminaciones provenientes del exterior, se procura controlar los brotes con medidas de cuarentena y de vacunación. Las áreas afectadas son puestas en cuarentena y se procede inmediatamente a la vacunación de todos los animales susceptibles en una ancha zona de protección (Bruner and Gillespie, 1966). Un método que combina el sacrificio de los animales infectados con la vacunación zonal alrededor del foco infeccioso fue utilizado para suprimir el extenso brote que ocurrió en México de 1946 a 1953 (Bachrach, 1968).

En América del Sur actualmente se realizan campañas de vacunación que cubren entre el 80 y el 90 % de los rumiantes existentes en la mayoría de las áreas bajo programa.

En países como Argentina, donde la enfermedad es endémica, el control se realiza mediante la inmunización preventiva de todo el ganado y el seguimiento epidemiológico de cualquier foco de la enfermedad. Generalmente, existen "nidos" de infección en áreas de cría extensiva con alto porcentaje de animales portadores. A esto se suma el nacimiento de terneros que incorporan al medio nuevos animales susceptibles y la existencia de una fauna silvestre que incrementa la dotación de reservorios. Cuando se produce una ruptura de inmunidad en estas zonas, los animales son mantenidos en cuarentena y se vacuna sistemáticamente a todos los animales susceptibles que circundan el área (Centro Panamericano, Banco de datos, 1972-81).

Desde 1993 se puso en marcha en la Argentina el "Plan Nacional de Control y Erradicación de la FA", con distintas estrategias según las características regionales. Actualmente, son consideradas "libres de enfermedad" las provincias que se encuentran ubicadas al sur del paralelo 42 (Chubut, Río Negro y Tierra del Fuego), registrándose el último brote en Tierra del Fuego en el año 1966 (SENASA, boletín informativo Julio 1994).

Es importante destacar que, como resultado de este plan, en abril de 1996 Argentina cumplió su segundo año sin que se hayan registrado brotes de la enfermedad.

Esta situación ha permitido en 1995 el aumento de las exportaciones de carne desde la Argentina a los Estados Unidos, Comunidad Económica Europea y Brasil, así como la apertura de mercados en el sudeste asiático (Malasia) y América del Sur (Chile).

I.2. VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

I.2.1. Características generales de los Picornavirus

Picornaviridae es una familia diversa, de virus pequeños, con genoma ARN (+) infeccioso de cadena simple, poliédrico y sin envoltura.

Sobre la base de sus propiedades fisicoquímicas, como la estabilidad en condiciones ácidas y la densidad de flotación, la familia Picornaviridae ha sido dividida en cinco géneros principales

- a) enterovirus: poliomielitis, hepatitis A, coxsackie, echovirus en humanos enterovirus en animales y poliovirus en ratón.
- b) rinovirus: rinovirus humanos y bovinos.
- c) cardiovirus: mengovirus y el virus de la encefalomiocarditis.
- d) aphtovirus: virus de la fiebre aftosa.
- e) hepatovirus: virus de la hepatitis A .

Estos grupos se diferencian tanto por sus propiedades fisicoquímicas y serológicas, como también por las características propias de la infección que producen en los hospedadores susceptibles.

Cada género es a su vez subdividido en tipos y subtipos mediante la caracterización de sus Ags de superficie (Cooper et. al., 1978; Sangar, 1979).

Como propiedades generales de los Picornavirus se destacan:

1.- Cápside viral compuesta por 60 copias de cada una de las proteínas virales estructurales. Estas proteínas poseen una estructura tridimensional que se encuentra muy conservada en todos los miembros de la familia (Acharya et. al., 1989).

2.- Genoma consistente de una única molécula de ARN (+) infeccioso tanto *in vivo* como *in vitro* (Alexander et. al., 1958).

3.- Traducción del ARN viral en una poliproteína cuyo procesamiento, producido en varias etapas, da lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Grubman et. al., 1984; Kitamura et. al., 1981).

4.- Replicación del ARN incluyendo síntesis de una cadena de ARN (-), complementaria al ARN viral, a través de un intermediario replicativo que puede ser aislado de células infectadas. El complejo de replicación está asociado a la membrana celular e incluye a la polimerasa viral y al ARN que es utilizado como templado (Grubman et. al., 1984; Semler et. al. 1981).

Algunas de las propiedades particulares que poseen estos Picornavirus se describen en tabla 1.

TABLA 1 Propiedades emergentes de los Picornavirus

	Enterovirus	Cardiovirus	Rinovirus	Aftovirus
Miembros (nº de serotipos)	Polio (3) Coxsackie A (23) Coxsackie B (6) ECHO (31) Hepatitis A (1) Enterovirus Humanos y animales (40)	Encefalomiocar- ditis Mengo, Thelier Maus Elberfeld Columbia SK, etc	Humanos (113) Bovinos (12)	Virus de la Fiebre Aftosa (7)
Rango de Huéspedes	Estrecho	Amplio	Estrecho	Amplio
Diámetro (nm)	22 - 28	24 - 30	24 - 30	23 - 25
Estabilidad al pH	estable a pH= 3 - 10	lábil a pH= 5 - 7 en presencia de 0.1M Cl o Br	lábil a pH <5	lábil pH <6.5
Densidad en CICs (g/ml)	1.34	1.34	1.39 - 1.42	1.43 -1.45
Coficiente de sedimentación (*)	156 S	156 S	149 S	142 - 145 S
% ARN	29	31	30	31.5

*En gradiente de sacarosa (fuerza iónica 0.04 - 0.15) pH 7,3-7,6
La información fue tomada de Brooksby, 1982.

I.2.2. Características generales del VFA

El VFA, es el único miembro del género aftovirus dentro de la familia Picornaviridae. Existen 7 tipos serológicos determinados por la técnica de fijación de complemento: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1 y cerca de 67 subtipos incluidos en estos 7 tipos (Bachrach, 1977). A su vez, cada subtipo agrupa a muchas cepas.

El VFA posee una cápside desnuda de 30 nm de diámetro. Tiene un peso molecular de aproximadamente 7×10^6 daltons y contiene un genoma de cerca de 8500 nucleótidos (Bachrach, 1977). Su composición química es de un 30% ARN y un 69% proteínas (Rueckert, 1985).

I.2.2.1 Estructura de la cápside

La cápside viral posee forma icosaédrica y está compuesta por 60 copias de cada una de 4 proteínas designadas VP1, VP2, VP3 y VP4 (Cooper et al., 1978) producidas por clivaje post-traducciona l de un precursor común (Sanger et al., 1979). Estas mismas cuatro proteínas estructurales también se denominan: 1A, 1B, 1C y 1D, respectivamente (Rueckert and Wimmer, 1984). Además, contiene 2 proteínas minoritarias (1-2 copias por virión): VP0 (precursora de VP2 y VP4) y 3D (polimerasa viral).

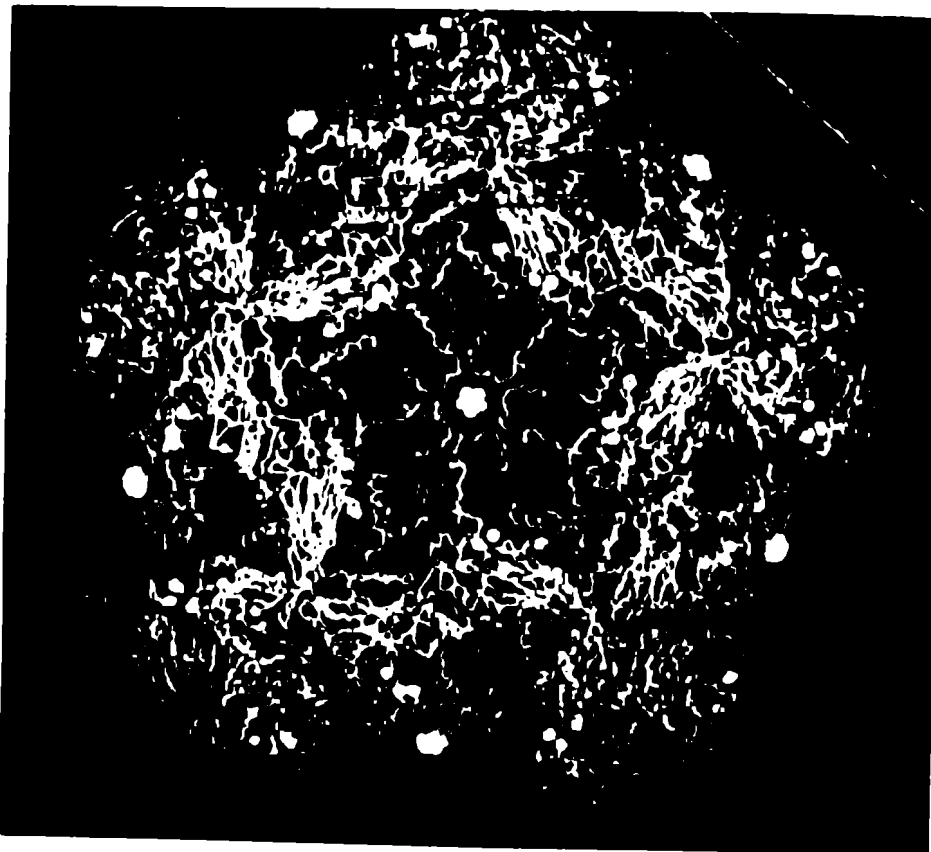


Figura 1. Representación de la estructura, a nivel atómico, de la cápside del VFA O₁K. En azul se muestran los residuos de VP1, en verde los de VP2 y en rojo los de VP3. Las esferas punteadas de color azul y situadas en la superficie del virión corresponden a los aminoácidos 133-158 de VP1 (Acharya et al., 1989).

Recientemente, la estructura tridimensional de la cápside del VFA de los serotipos O y C fue determinada por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado (Fox et.

al., 1987; Achayra et. al., 1989; Lea et. al., 1994). Estos estudios predicen que aunque difieren en secuencias, VP1, VP2 y VP3 adoptan una misma configuración espacial denominada "barril β ". Esta estructura consiste en ocho cadenas de estructura β , plegadas una sobre otras a manera de un sandwich. Cada hoja esta formada por cuatro cadenas una sobre la otra conectada por bucles que sobresalen de la superficie, siendo las cadenas β las que forman las paredes del barril (BIDG la anterior y CHEF la posterior). Los bucles entre las cadenas son identificados por las letras que denominan las cadenas que conectan; así el bucle G-H conecta las cadenas β G y H (figura 2).

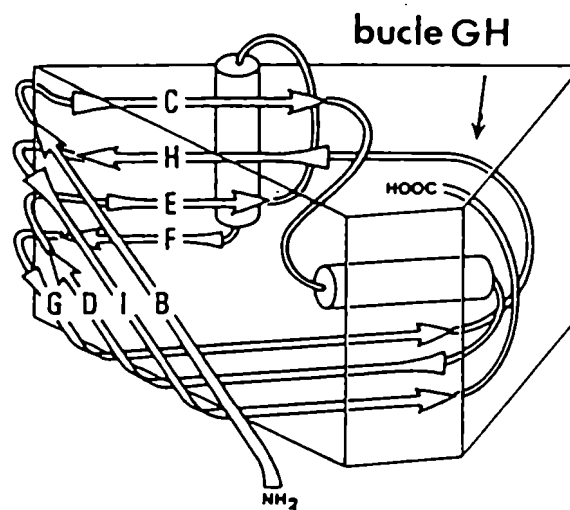


Figura 2. Representación esquemática de la estructura "barril β " que adoptan VP1, VP2 y VP3 (Hogle et al., 1985). Las hojas plegadas β están representadas por flechas e identificadas por letras (B a I). Las estructuras en forma de hélice α se representan como cilindros.

La subunidad biológica o protómero corresponde a una molécula de VP1 asociada a una de VP2 y a otra de VP3 perteneciente al área triangular adyacente, adquiriendo en conjunto una forma similar a un "barrilete". Los protómeros, a su vez, se agrupan en pentámeros que son la principal de las estructuras en que se disocia la partícula viral

completa al ser expuesta a pH menores a 5 (Fry et al., 1990). Doce de estos pentámeros son los que se asocian para conformar la estructura icosaédrica que presenta el virión.

El VFA presenta una superficie externa relativamente lisa ya que, a diferencia de otros picornavirus, parece no poseer "cañones" ni "agujeros" (Luo et. al., 1981).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen una masa molecular de aproximadamente 24000 daltons, mientras que la de VP4 es de 7000 daltons (Boothroyd et. al., 1989).

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146 Svedbergs (partícula 146 S). La partícula 146 S es fácilmente disociable por tratamiento a pH < 5.5 en subunidades virales 12 S (Rueckert, 1985), que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a VP4 (Burroughs et. al., 1971).

Existe además otro tipo de partícula viral, con un coeficiente de sedimentación de 75 S, que corresponde a la cápside vacía. Este es un producto naturalmente defectivo que contiene VP1, VP3 y VP0 pero no contiene ARN (Van der Wonde et. al., 1972).

La proteína VP1 posee los determinantes antigénicos principales del VFA y está involucrada en el reconocimiento del receptor en la célula blanco (Fox et. al., 1989). Esto fue demostrado cuando, por el clivaje de VP1 (mediante el tratamiento del virus con tripsina), se perdió la capacidad infectiva, la inmunogenicidad (Wild et. al., 1969) y la habilidad del virus de interactuar con su receptor celular en la célula intacta (Baxt and Bachrach, 1982).

La hipótesis del "cañón", que ha sido descrita para los rinovirus HRV 14 (Rossman et. al., 1987), poliovirus (Hogle et. al., 1985) y mengovirus (Luo et. al., 1987), propone que el sitio de unión a la célula se encuentra en una depresión, ocultándolo del sistema inmune; el VFA, en cambio, no se ajusta al modelo propuesto sino que en este virus, la porción más inmunogénica de la cápside forma una protrusión desordenada (loop) en la superficie del virión (Fox et. al., 1989).

I.2.2.2. Genoma

Como otros picornavirus, el VFA posee una cadena simple de ARN positivo de aproximadamente 8500 nucleótidos con una pequeña proteína, VPg, covalentemente unida a su extremo 5', un segmento interno de poli (C) cerca del extremo 5' y una secuencia poli (A) en su extremo 3' (Bachrach, 1977; Sangar, 1979). La masa molecular de ARN es aproximadamente de $2,8 \times 10^6$ daltons y la infectividad del ARN libre es 10^6 veces menor que la del virus intacto (Denoya et. al., 1978).

Poli (A)

La longitud del poli (A) varía entre 40 y 100 nucleótidos (Chatterjee et. al., 1976; Porter et. al., 1978). El papel de esta región no está claro, pero se ha demostrado en el virus de la encefalomiocarditis y en poliovirus que los genomas con poli (A) naturalmente más corto (Goldstein et. al., 1976) o artificialmente acortados (Spector and Baltimore, 1974) tienen una infectividad específica menor que aquellos con secuencias de poli (A) más largas, lo que indicaría que esta región es importante para la infectividad.

VPg

A diferencia de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares y virales, el ARN de los picornavirus no posee un grupo CAP ($m^7G(5')pppG(5')-Np$) en su extremo 5' (Fernández-Muñoz and Darnell, 1976). Sin embargo, en varios picornavirus (incluyendo al VFA) se encontró una proteína de bajo peso molecular, denominada VPg, unida covalentemente a este extremo (Lee et. al., 1977; Golini et al., 1978). Varias observaciones sugieren que la VPg (o su precursor) está involucrada en la replicación del ARN, aunque su papel preciso no está claro.

Poli (C)

Otra de las características del VA compartida con los cardiovirus, es la presencia de residuos de poli (C) cercanos al extremo 5' (Harris and Brown, 1976). La longitud del poli (C) es variable (entre 100 y 200 residuos) dependiendo de la cepa viral. Asimismo, existe variación de tamaño entre virus obtenidos de diferentes aislamientos o de distintos hospedadores (Costa Giomi et. al., 1984).

La función precisa del poli (C) es desconocida. Se ha planteado que aquellos virus que presentan el tracto de poli (C) acortado son menos virulentos (Harris and Brown, 1976, Escarmis et. al. 1992). Sin embargo, los intentos de relacionar el tamaño del poli (C) con virulencia no fueron exitosos (Costa Giomi et. al. 1984 y 1988; Parisi et. al., 1985).

Regiones no codificantes

El ARN contiene, además de la región codificante, dos regiones extracistrónicas. La "región 5' no codificante" (de aproximadamente 1200 nucleótidos) está formada por la región S hacia el extremo 5' (de 400 nucleótidos) y la región L (de aproximadamente 800 bases), entre estas dos zonas está ubicado el fragmento poli (C). En la región L se

encuentran bases de importancia en la regulación de la iniciación de la traducción. La "región 3' no codificante" posiblemente es relevante en la iniciación de la síntesis de ARN negativo.

I.2.3. Ciclo replicativo del VFA

El ciclo infectivo del VFA es un proceso rápido que culmina en aproximadamente 2 horas y media. La infección en cultivos celulares se inicia con la adsorción, continúa con la replicación y el ensamblado, que suceden en el citoplasma de la célula hospedadora, y por último culmina con la liberación del virus por lisis celular (Rueckert, 1985).

I.2.3.1 Adsorción

La adsorción es un proceso reversible cuya etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, siendo requerida la presencia de cationes bivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), sin los cuales el fenómeno no ocurre (Brown et. al., 1962). Esta etapa es de particular interés ya que representa un importante determinante de la susceptibilidad celular a la infección, cumpliendo un destacado rol en el tropismo y la patogenia del virus (Crowell and Landau, 1979).

El primer evento en la infección de los picornavirus implica la unión del virus a receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la célula (Crowell and Landau, 1979). En cultivos de células de riñón de cerdo se encontraron entre 30 y 100 receptores por célula (Brown et. al., 1962). Por otra parte, estudios realizados en células de riñón de hamster bebé (BHK-21) demostraron la existencia de 1 a $2,5 \times 10^4$ receptores virales por célula para los virus tipo A12 y O1 (Baxt and Bachrach, 1980). Los mismos autores indicaron que los virus tipo A, O y C pueden utilizar, al menos, algunos receptores comunes. En base a resultados de inactivación por acción de la tripsina, la VP1 (como se mencionó anteriormente) ha sido postulada como la proteína viral involucrada en la unión al receptor (Cavanagh et. al., 1977; Baxt et. al., 1984). Para la adsorción del virus a células BHK-21 es esencial la secuencia Arg Gly Asp en el "loop" G-H de la proteína VP1 (Brown et. al. 1988; Mason et. al. 1994), aunque el virus puede penetrar también formando complejos antígeno-anticuerpo utilizando el receptor Fc en la superficie de la célula a infectar (Mason et. al, 1994). Recientemente, se ha observado que el receptor en células LLC-MK2 es una integrina que actúa normalmente como receptor de la vitronectina, aunque no se puede desechar la posibilidad de que el virus use otros receptores celulares (Berinstein et. al., 1994).

I.2.3.2 Penetración y desnudamiento

El proceso de entrada del VFA a través de la membrana está bien diferenciado del de enterovirus y rinovirus. En estos últimos, la entrada a través de la membrana involucra la alteración de las partículas virales las cuales se caracterizan por haber perdido VP4 y ser sensibles al tratamiento con SDS al 1 % (De Sena and Mandell, 1977). En el VFA y en cardiovirus, sin embargo, no se ha descrito ningún tipo de estructura intermediaria (Baxt et. al., 1984).

La penetración dentro de la célula hospedadora parece ser dependiente de la disponibilidad de energía ya que no ocurre en células muertas aún cuando el virus permanece absorbido a su superficie (Brown et. al., 1962). El mecanismo propuesto para el ingreso del genoma viral en el citoplasma celular es la endocitosis mediada por el receptor. Se ha demostrado que el pH ácido de las vesículas prelisosomales (endosomas) proporcionan el medio necesario para la ruptura del virus en las subunidades virales 12 S, dejando el ARN genómico libre para iniciar su replicación (Carrillo et. al., 1984 y 1985).

I.2.3.3 Mecanismo de replicación del ARN genómico

El genoma viral liberado al citoplasma se une a los ribosomas y demás proteínas de la maquinaria biosintética de la célula hospedadora. La traducción del ARN comienza en su extremo 5' resultando en una poliproteína que es rápidamente procesada (Arlinghaus and Polatnick, 1969).

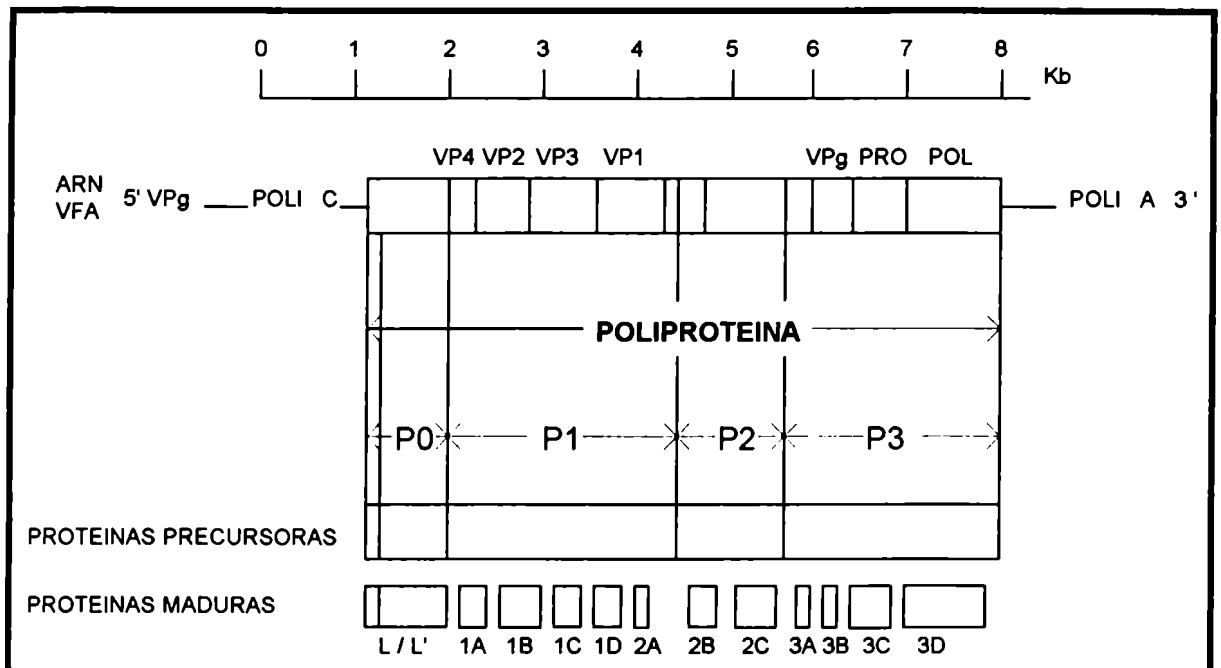
La replicación del ARN viral involucra la síntesis de una cadena complementaria de polaridad negativa (-) que es utilizada para amplificar el número de cadenas de ARN (+). El proceso de replicación tiene lugar por medio de la formación de un intermediario replicativo compuesto por cadenas de ARN (+) y ARN (-) asociado al retículo endoplasmático liso (Perez Bercoff, 1979).

I.2.3.4. Síntesis de proteínas virales y formación del virión maduro

Tempranamente, luego de la infección de las células por el VFA, se produce la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas celulares (Lucas Lenard, 1979). Esto coincide con la aparición de los primeros productos virales identificables. El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante de aproximadamente 250 Kd (Forss et. al., 1984). Dicho precursor poliproteico no se detecta dado que los primeros clivajes tienen lugar durante la traducción, originando 4 proteínas precursoras primarias que a través de clivajes

secundarios (mediados por proteasas virales) generan las proteínas estructurales y no estructurales que se encuentran en células infectadas.

Existen dos sitios de iniciación de la traducción encuadrados en el mismo marco de lectura, los cuales resultan en dos proteínas "leader": L y L' que poseen la misma secuencia carboxiterminal pero difieren en la zona aminoterminal (Sangar et. al., 1980). Los péptidos precursores se encuentran dispuestos de acuerdo al orden de traducción 5'-3' y son: P0 (L/L'), P1 (1ABCD-2A), P2 (2BC), P3 (ABCD)



I.2.3.5. Empaquetamiento del ARN viral

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el empaquetamiento del ARN viral aún no se ha dilucidado en detalle. Evidencias experimentales han relacionado a este proceso con la replicación del ARN. La síntesis del ARN podría dar la energía necesaria para la inserción del mismo en la procápside o para la formación de un núcleo de ARN (Rueckert, 1985).

La entrada de la molécula de ARN en la procápside (partícula vacía) resulta en la formación del provirión, de este modo se protege al genoma viral de la acción de nucleasas (Fernandez Tomas and Baltimore, 1973). La formación del virión maduro de 146 S involucra el clivaje de casi la totalidad de cadenas VP0 para originar VP2 y VP4, lo que lleva al reordenamiento de la cápside y constituye el último paso de la maduración viral (Rueckert, 1976).

I.2.3.6. Liberación del virión

I.2.3.6. Liberación del virión

En células de riñón bovino, infectadas con alta multiplicidad de infección, la fase de eclipse dura de 100 a 110 minutos (Polatnick and Bachrach, 1964) comenzando a detectarse virus extracelular a los 150 minutos post-infección. Aunque probablemente las partículas virales alcanzan el espacio extracelular como resultado de una lisis mecánica de las células infectadas (Rueckert, 1976), existe cierta evidencia de una liberación prelitica del virus a través de vesículas citoplasmáticas que emergen de células infectadas (Yilma et. al., 1978).

I.2.4. Características antigénicas del VFA

El primer análisis antigénico de la estructura del VFA mostró que sueros de animales vacunados o infectados con VFA reconocen 2 componentes en las preparaciones de virus purificado: i) viriones 146 S y ii) subunidades 12S. Sólo los Acs anti-146 S son tipo específicos ya que las partículas 12 S reaccionan con antisueros heterotípicos (Brown and Crick, 1958). Algunos epitopes son compartidos por ambas partículas ya que la actividad anti-146 S de un suero se ve disminuída cuando éste es adsorbido previamente con partículas 12 S (Cowan, 1968).

La primer idea de que sólo la partícula 146 S induce la producción de AcN (Brown et. al., 1963) fue desafiada por el hecho de que cerdos y bovinos inmunizados con subunidades proteicas 12 S emulsificadas en adyuvante oleoso resistían la infección con el virus homólogo (Morgan et. al., 1980).

Bachrach y colaboradores (1975) presentaron la primera evidencia sobre la efectividad de VP1 como la única proteína estructural capaz de inducir una respuesta inmune protectora en cerdos y cobayos. Más tarde también se demostró la protección conferida por VP1 del Virus A12 en bovinos y cobayos (Bachrach et. al. 1982), sin embargo VP1 aislado del VFA tipo O1 confería poca o ninguna protección frente al desafío viral (Meloan et. al, 1986).

El primer esfuerzo en la identificación de epitopes inmunodominantes en partículas del VFA fue la demostración de que el tratamiento enzimático del virus altera su reactividad antigénica (Barteling et. al., 1979). Sin embargo, preparaciones del virus tipo A12 tripsinizado, conteniendo péptidos VP1a y VP1b en mayor proporción que VP1 intacta, fueron capaces de inducir aproximadamente la misma respuesta de Acs anti-virus en cobayos que el virus sin tratamiento. Así mismo, una mezcla aislada de fragmentos de VP1 en cobayos indujo una fuerte respuesta de AcN demostrando la existencia de un epitope tripsina resistente funcional en estado intacto (Bachrach et. al., 1979). Estos

datos preliminares sostienen que VP1 tiene un predominante papel inmunogénico y por otra parte que posee varios epitopes protectores.

Basados en estudios de secuenciación de variantes antigénicas que escapan a la neutralización ejercida por AcM neutralizantes, como así también en ensayos de competencia en la reactividad con AcM entre virus y péptidos sintéticos que mimetizan segmentos de la partícula viral, se han identificado sitios antigénicos en los serotipos A (Baxt et. al., 1989; Saiz et. al., 1991; Thomas et. al., 1988), O (Kitson et. al., 1990; Xie et. al., 1987; Parry et. al., 1985 y 1989) y C (Mateu et. al., 1989 y 1990; Lea et. al., 1994) del VFA, los cuales se hallan distribuidos en tres de las cuatro proteínas estructurales.

Los epitopes virales lineales se han localizado en la mitad carboxiterminal de VP1, ya que fragmentos de esta zona obtenidos por diferentes métodos (clivaje con agentes químicos o péptidos sintéticos) también inducen AcN (Pfaff et. al., 1982; DiMarchi et. al., 1986; Zamorano et. al., 1994).

En particular, se ha identificado un estrecho segmento dentro de VP1, comprendido entre los residuos aminoácidos 140-160 ("sitio A"), que contiene los epitopes más importantes para la inducción de AcN (Pfaff et. al., 1982; Bittle et. al., 1982; Winther et. al., 1986; Doel et. al., 1988).

En el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 se halla otro sitio antigénico, el "sitio C", que incluye los últimos catorce aminoácidos (residuos 200-213). Si bien en el serotipo C este sitio es independiente del "sitio A"; en el serotipo O, el "sitio C" forma con el "sitio A" un solo sitio discontinuo, llamado "sitio Y". Estudios de cristalografía y difracción de rayos X han revelado que este sitio se encuentra en un "loop" (el "loop" GH de la proteína VP1) protruyente y móvil (Acharya et. al., 1989; Lea et. al., 1994).

Investigaciones llevadas a cabo con AcM han determinado la existencia de otros epitopes sobre VP2 y VP3 (Thomas et. al., 1988; Baxt et. al., 1989; Kitson et. al., 1990). En los serotipos A, O y C se encuentra formado por parte de las proteínas VP2 (el "loop" BC, aminoácidos 70 a 80) y VP3 (el "knob" BB, aminoácidos 58 a 61). En el serotipo O, el "loop" EF de la proteína VP2 (aminoácidos 131 a 134), también participa de este sitio antigénico.

En el serotipo O se ha identificado otro sitio antigénico en el "loop" BC de la proteína VP1 (aminoácidos 43 a 48) llamado "sitio III". Así mismo, se ha encontrado que algunas sustituciones en este sitio pueden alterar la antigenicidad del "sitio A" (Parry et. al., 1990). En el serotipo A un sitio equivalente a este sería el hallado en el "loop" HI (alrededor del aminoácido 170).

1.3 RESPUESTA INMUNE DURANTE LA INFECCION VIRAL

En una infección viral se inducen mecanismos de respuesta innatos (inespecíficos) y adaptativos (específicos). La importancia de los distintos mecanismos varía de un virus a otro (Ogra et. al., 1975).

Las defensas no específicas producidas por la infección incluyen, entre otros, la producción de interferón (IFN) (Sen et. al., 1993), células natural killer (NK) (Welsh et. al., 1989) y fagocitosis mediada por una opsonización complemento dependiente (Welliver et. al., 1988; Buttner et. al., 1993). Si la infección viral sobrevive a esta primera defensa el sistema inmune adaptativo será activado por las células presentadoras de antígeno (CPA) (Barnett et. al., 1987).

Las células T específicas contra el antígeno (Ag) actúan ya sea modulando la respuesta humoral así como incrementando la eficiencia de la respuesta inflamatoria no específica mediante la secreción de interleuquinas (IL) (Campos et. al., 1991).

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ ocupan un papel central en la protección inmunológica contra enfermedades virales (Koszinowski et. al., 1991). Células T colaboradoras CD4+, específicas para el Ag, proliferan cuando son estimuladas con el Ag viral procesado por una CPA en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II.

En ratones, dos grupos de linfocitos T colaboradores (CD4+) han sido identificados por sus perfiles únicos de secreción de linfoquinas y por su capacidad de regularse entre sí (Mosmann et. al., 1991). La función de estos dos subgrupos es crucialmente diferente y tiene efectos profundos en la especificidad de la respuesta inmune. Los linfocitos T colaboradores 1 secretan IL-2, IFN- γ y TNF α (factor de necrosis tumoral) y están relacionados con la eliminación de las células infectadas. Actúan modulando la respuesta de las células T citotóxicas (CD8+), fagocitos activados y células NK. Los linfocitos T colaboradores 2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 y están relacionados con el desarrollo de la respuesta de Acs cooperando con las células B específicas para el Ag estimulante (Romagnani et. al., 1991).

Sin embargo, aunque la respuesta celular es clásicamente responsable de la eliminación de las células infectadas, la inmunidad a muchas infecciones virales está mediada por Acs, y en algunos casos ambos elementos de la respuesta inmune están involucradas en la eliminación del virus (Martín et. al., 1986).

El mecanismo por el cual un anticuerpo (Ac) neutraliza a una infección viral depende tanto del agente viral como del isotipo del Ac que es producido. Las inmunoglobulinas poliméricas (IgA secretoria e IgM) pueden mediar la eliminación del virus por agregación o por incrementar la fagocitosis del sistema retículo endotelial (Sissons et. al., 1980). Las IgG e IgM son muy eficientes en la fijación de complemento y en la

opsonización de complejos inmunes lo que facilita la captura por fagocitosis (Dorrington et. al., 1978). Los virus envueltos especialmente, pueden ser directamente eliminados por Acs y fijación de complemento. A su vez, células infectadas por virus envueltos pueden ser lisadas por la acción directa de Acs y complemento o por las células citotóxicas dependientes de Ac (ADCC) (Roitt et. al., 1985).

Los mecanismos de neutralización viral directa son varios y contemplan la interferencia o bloqueo de la adsorción, de la entrada, o del desnudamiento de la partícula viral (Dimmock et. al., 1984).

I.3.1. Respuesta inmune a Picornavirus

La infección por picornavirus induce una respuesta celular y humoral en el hospedador siendo el elemento más importante de la respuesta la producción de AcN específicos contra las proteínas estructurales del virus.

El papel de los linfocitos T citotóxicos (LTC) en ratones ha sido descrito en la infección con virus coxsackie B-3, en la infección no permisiva con poliovirus (Kutubuddin et. al., 1992) y en la infección persistente en cepas de ratones permisivas con el virus de la encefalitis murina de Theiler (TMEV) (Pena Rossi et. al., 1991). La importancia de los AcN en la eliminación de la infección en ratón con TMEV fue demostrada por el aislamiento de variantes en las cuales se correlacionaba la resistencia a la neutralización por sueros hiperinmunes y la habilidad de producir una infección persistente (O'Shea et. al., 1992).

Mason y colaboradores (1993) demostraron que, bajo ciertas condiciones, el complejo formado entre el Ac y el VFA puede infectar células no permisivas. Sin embargo, Outlaw y colaboradores (1991) propusieron que la neutralización del VFA es debida a un bloqueo en la entrada del virus a la célula mediada por una interferencia estérica con el receptor más que con una estabilización de la cápside viral lo que causaría un ineficaz desnudamiento en el citoplasma de la célula infectada.

I.3.2. Respuesta inmune frente al VFA

La inmunidad contra el VFA está mediada por AcN contra las proteínas estructurales del virus (Van Bekkum, 1969).

El método de seroneutralización (SN) *in vitro* empleado habitualmente solo permite determinar la capacidad de los Acs de neutralizar partículas víricas, desconociéndose el papel de los restantes mecanismos mediados por Acs (opsonización, complemento, ADCC) en la protección *in vivo* frente al VFA. Amadori y colaboradores, en 1992 fueron los únicos en describir que leucocitos bovinos de sangre periférica son capaces de

manifestar una actividad específica similar a las células NK lisando células infectadas con VFA en cultivo.

Investigaciones realizadas mediante ensayos de linfoproliferación *in vitro* confirman que la reactividad de las células T contra péptidos de VFA se encuentra restringida por CMH de clase II (Glass et. al., 1991). Trabajos posteriores realizados con péptidos sintéticos de VFA han identificado epitopes B y T en las proteínas estructurales del virus en bovinos, cobayos y ratones (Collen et. al., 1991; Zamorano et. al., 1994 y 1995).

En bovinos, utilizando ensayos *in vitro*, es posible detectar la aparición de AcN a los 3 o 4 d.p.i coincidiendo con el inicio de la viremia (Francis, et. al. 1983). Estas primeras inmunoglobulinas producidas son IgM e IgA y tienen su pico máximo entre los 10 y 15 días desapareciendo alrededor del día 40 (Brown et. al., 1964; Abu et. al., 1981). Días después de la aparición de las IgM e IgA, aparece en el suero la IgG que a los 21 días constituye el isotipo predominante. La capacidad de neutralización *in vitro* de la fracción IgG es cuantitativamente baja en un principio y aumenta con el tiempo hasta representar, a los 60 días, el total de la actividad neutralizante (Mulcahy et. al. 1990).

El desarrollo de la respuesta humoral coincide con la eliminación de las lesiones, terminación de la viremia y reducción de la excreción viral. En los bovinos se ha descrito que los títulos de AcN duran por más de 4 años luego de la aparición de la infección (Sadir et. al. 1988; Lopez, et. al. 1991).

1.3.2.1. Respuesta inmune en ratones al VFA

El estudio de la respuesta inmune al VFA en bovinos ha sido limitado debido a la imposibilidad de trabajar con animales endocriados, el conocimiento incompleto de su sistema inmune, su excesivo costo, así como la virtual imposibilidad de realizar estudios sobre los mecanismos de acción *in vivo*.

Por el contrario, el ratón ha sido utilizado como modelo experimental para el estudio de la respuesta inmune contra muchos tipos de virus debido al exhaustivo conocimiento que se posee sobre su sistema inmune. Los ratones adultos no son susceptibles a la infección natural con VFA sin embargo pueden ser experimentalmente infectados (Cunha and Eichorn, 1954; Subak-Sharpe, 1961 y 1962). Luego de la inoculación intraperitoneal (i.p.) de un alto número de partículas virales, los ratones manifiestan una infección subclínica que involucra replicación viral, principalmente en células pancreáticas, acompañada de una viremia durante 72 hs post-infección (Fernández et. al., 1986). A partir del momento en que se detecta un aumento significativo de AcN, se observa una rápida disminución del virus en sangre y órganos hasta su desaparición total. En ratones inmunosuprimidos por irradiación o quimioterapia se observa la correlación entre la falta de AcN y la prolongación de la viremia. Por el contrario, cuando estos animales son

reconstituidos con células inmunocompetentes provenientes de ratones inmunizados con virus activo se observa simultáneamente la eliminación de la viremia y la aparición de AcN (Borca et. al., 1984 y 1986).

Estudios en torno al papel de las células T en la respuesta inmune al VFA, en cobayos (Knudsen et. al., 1979; Francis et. al., 1985) y ratones (Collen et. al., 1984) sugieren que el sistema T cumple un papel importante en los mecanismos de defensa contra el VFA, particularmente en el establecimiento de memoria inmunológica. Sin embargo resulta evidente que los linfocitos T no son necesarios en el mecanismo intrínseco de la eliminación viral ya que la transferencia de células B obtenidas de ratones infectados son suficientes para eliminar la viremia en animales receptores previamente inmunodeprimidos e infectados (Borca et. al., 1986).

Como anteriormente se mencionó, la infección en ratones con VFA induce un estado de inmunidad que resulta protectora de por vida, mientras que la inmunización con baja dosis de VFA inactivado (0,1µg) lo hace por un período de tiempo muy breve. La inmunidad inducida por la infección viral parece no ser el resultado de una infección persistente (Lopez et al., 1990). También se ha demostrado que la magnitud y duración de la respuesta inmune humoral, en términos de AcN, inducida por la infección experimental o por inmunización con altas dosis de VFA inactivado (10µg) resulta ser similar. Así, linfocitos B provenientes de estos animales son capaces de eliminar la infección en receptores inmunodeprimidos sin intervención de linfocitos T. Mientras que, la respuesta a la infección mediada por células B sensibilizadas con bajas dosis de virus inactivado (0,1µg) es eficiente sólo cuando células T específicamente sensibilizadas están presentes (Piatti et. al., 1991).

I.4. VACUNAS CONTRA EL VFA

Las primeras vacunas contra el VFA se elaboraron utilizando epitelio lingual bovino proveniente de animales infectados, el virus era inactivado con formol y se utilizaba hidróxido de aluminio como adyuvante (Beling et. al; 1953).

A principios de la década del '50 se desarrolló un sistema que consiste en la producción en gran escala de antígeno *in vitro*, en epitelio lingual bovino (Frenkel, 1951), permitiendo la implementación de programas de vacunación.

A partir de estas etapas pioneras, la producción de virus para vacunas en cultivos de células evolucionó gradualmente. En la década del '60 se desarrollaron métodos de producción de virus basados en cultivos primarios de células (Ubertini et. al., 1963) y cultivos de líneas celulares como BHK-21 (Stoker and Macpherson, 1964), que son los más utilizados actualmente. No obstante, en algunos países se continúa utilizando el método Frenkel.

En general la producción de vacunas a virus inactivado debe cumplir esencialmente 4 requerimientos críticos.

-se debe disponer de Ag viral en alta concentración y cantidad suficiente para permitir la producción de vacunas en gran escala.

-la preparación viral debe ser inactivada en forma total

-el antígeno viral inactivado debe preservar su estructura antigénica

-se debe agregar un adyuvante que estimule la respuesta inmune del animal hasta los niveles de protección deseados.

I.4.1 Vacunas en uso

La mayoría de las vacunas contra el VFA actualmente en uso se basan en la utilización de virus inactivado con adyuvante oleoso (Rivenson et. al., 1977).

Los dos agentes inactivantes empleados más frecuentemente son el formol y las aziridinas.

El formol tiene como desventaja que la cinética de inactivación no es de primer orden por lo que se corre el riesgo de que quede virus infectivo residual en la vacuna (Wesslen and Dinter, 1957; Graves, 1963). De hecho, ciertos brotes Europeos y Sudamericanos han sido atribuidos a esta causa (King et. al., 1981; Beck and Stromhaier, 1987; Bergman et. al., 1988).

Las aziridinas, en cambio, presentan una cinética de inactivación de primer orden, rápida y su acción sobre las proteínas es mínima (Brown et. al., 1963; Bahneman, 1975). Sin embargo estos inactivantes son altamente tóxicos y cancerígenos, debiéndose manejar con extrema precaución y neutralizarlos completamente antes de utilizar la vacuna.

Comercialmente sólo 3 adyuvantes son utilizados para la elaboración de vacunas anti-VFA: hidróxido de aluminio, saponina y emulsión oleosa; las primeras dos son conocidas como vacunas acuosas y la tercera como vacuna oleosa, como las desarrolladas por Freund donde el Ag es emulsificado en un aceite mineral (Barteling and Vreeswijk, 1991). La utilización de tipo oleoso durante la campaña de inmunización masiva confiere una inmunidad más efectiva y de mayor duración en bovinos y cerdos (Sadir et. al., 1988; Barteling and Vreeswijk, 1991).

I.4.2 Vacunas experimentales

El progreso en la producción de vacunas anti-VFA está dirigido hacia el logro de vacunas más eficientes en cuanto a la inmunidad conferida, más estables y sin efectos colaterales adversos.

En la última década se realizaron importantes progresos al identificar las secuencias nucleotídicas del genoma viral y las secuencias aminoácidas de las proteínas relacionadas. La introducción de la tecnología del DNA recombinante y las pruebas realizadas con péptidos sintéticos ha focalizado los esfuerzos en la construcción de "vacunas de nueva generación" (vacunas a virus vivo modificado, vacunas recombinantes y vacunas a péptidos sintéticos).

Son conocidos los problemas y riesgos que causa el uso de vacunas a virus vivo o atenuado, sobre todo el peligro potencial de generar infecciones persistentes o transmisibles. Es por ello que se prefiere utilizar vacunas a virus inactivado o elaboradas con fracciones antigénicas del agente infeccioso.

En los últimos años los adyuvantes han recibido una mayor atención debido a que las vacunas de nueva generación son en general inmunogénicamente pobres y requieren de adyuvantes para conferir una buena respuesta inmune (Rajesh et. al. 1993).

I.5. ADYUVANTES

Un adyuvante es una sustancia que actúa sobre un antígeno aumentando sus propiedades inmunogénicas y/o activando las células del sistema inmune (Jolles et. al., 1973).

Hace veinte años el desarrollo de adyuvantes era casi totalmente empírico pero con los adelantos tecnológicos actuales es posible empezar a dilucidar sus mecanismos de acción.

Según sus mecanismos de acción los adyuvantes pueden ser clasificados en aquellos que actúan a nivel del antígeno o aquellos que lo hacen sobre las células del huésped involucradas en la respuesta inmune.

I.5.1 Acción de los adyuvantes sobre el hospedador:

Estos mecanismos pueden ser resumidos de la siguiente forma:

1 - Liberación lenta del antígeno: La continua liberación de pequeñas cantidades de Ag semejaría una suerte de constantes reestímulos, lo que induciría y mantendría la memoria inmunológica. Actúan de esta manera las sales de aluminio y las emulsiones agua en aceite (Allison, 1973; Beh et. al., 1985).

2 - "Trapping linfocitario": Este fenómeno consiste en la migración selectiva de linfocitos circulantes hacia un órgano linfoide en especial. La importancia del "trapping" linfocitario reside en que el Ag se pone en contacto con una mayor cantidad de células inmunocompetentes. Este mecanismo es inducido por adyuvantes tales como Adyuvante

Completo de Freund (ACF) y Carynebacterium parvum entre otros (Lescelles et. al., 1989)

3 - Modificación de las membranas celulares: Muchos adyuvantes pueden unir el Ag a la membrana celular facilitando el contacto y tal vez la formación de puentes temporarios entre células colaboradoras, como macrófagos y linfocitos (Gall et. al., 1967; Edelman et. al., 1980).

4 - Acción sobre las células involucradas en la respuesta inmune: Los adyuvantes pueden actuar sobre las células involucradas en la respuesta inmune mediante la inducción de ILs. Estas células incluyen macrófagos fijos y en circulación, células de Langerhans, células dendríticas, linfocitos T y sus subpoblaciones, células plasmáticas, células natural killer, células efectoras de ADCC y a toda la variedad de los linfocitos B (Edelman et. al., 1980).

5 - Modificación de la clase o subclase de inmunoglobulinas (Igs) producidas: Como las distintas Igs cumplen distintas funciones, el cambio de isotipo en una respuesta modulada por un adyuvante puede traer como consecuencia una respuesta que, por ejemplo, active más eficientemente el complemento o que favorezca la unión a receptores de gran afinidad en monocitos (Burton et. al. 1985; Perez Filgueira et. al., 1995).

Experimentalmente, diferentes adyuvantes pueden producir una respuesta cualitativamente distinta para un mismo antígeno. En ratón, por ejemplo, se ha descrito el caso de un antígeno inductor de una fuerte respuesta mediada por IgE, mientras que el mismo antígeno emulsionado en ACF, produce una respuesta mediada principalmente por IgM e IgG. Una posible explicación es que fueron activados diferentes subgrupos de células T colaboradoras probablemente como resultado de la activación de distintas CPA (Esser and Radbruch, 1990; Finkelman et. al., 1990).

I.5.2. Acción de los adyuvantes sobre el antígeno

Entre los mecanismos de acción más conocidos se puede mencionar:

1 - Modificaciones conformacionales: Los adyuvantes oleosos o las bases alquílicas pueden inducir modificaciones a Ags proteicos por cambios estructurales o por alteración de su carga eléctrica (Jolles et. al. 1973). Así, se demostró que aumentando la hidrofobicidad de un antígeno se incrementa la respuesta mediada por células (Coon et. al. 1975).

2 - Transformación de haptenos: Es posible anexas cadenas hidrofóbicas a haptenos proteicos lo que trae aparejado un aumento de la agregación molecular y de la adherencia celular. La tendencia de las moléculas a agregarse y a adherirse a superficies celulares permite una mayor estimulación del sistema inmune (Heatley et. al., 1975). Los liposomas son un ejemplo de transformación de haptenos.

3 - Desnaturalización o particularización de Ag: Algunos adyuvantes pueden particularizar el Ag facilitando la asociación con las membranas de macrófagos o células dendríticas en los centros germinales favoreciendo la PA a los linfocitos específicos (Allison, 1973).

1.5.3 Vacunas anti-VFA formuladas con adyuvantes

Se ha estudiado el poder adyuvante de diferentes sustancias para la elaboración de vacunas anti-VFA más eficientes, ya sea utilizando como antígeno VI o con diferentes péptidos sintéticos.

Así, los liposomas han sido probados con péptidos sintéticos (Francis et al. 1985). Cobayos vacunados dos veces con 30 µgr de péptido correspondiente a la región 141-160 de la proteína VP1 del VFA tipo O1K incorporados a liposomas mostraron actividad neutralizante asociada a presencia de Ac anti-virus y Ac anti-péptido.

Así mismo, un péptido sintético representando el fragmento 141-160 de VP1 del VFA, polimerizado o copolimerizado con muramildipéptido-lys (MDP; N-acetil-muramil-L-D-isoglutamina) e inyectado en ratones vehiculizado en PBS, fue capaz de inducir Acs hasta los 70 d.p.v luego de dos revacunaciones (Chedid et. al. 1986).

Estudios de respuesta vacunal en cobayos con el VFA tipo A12 adicionado con distintas dosis de avridine (AVR) (una amina lipoidal sintética) en vehículos lipídicos o PBS han demostrado que la protección contra el desafío viral fue máxima y los niveles de Acs se relacionaron a la cantidad de AVR utilizada (Knudsen, R. 1982). La capacidad de AVR como adyuvante con el VFA tipo O1 Campos ha sido estudiada en ratones Balb/c (Berinstein et al., 1991) demostrándose como un muy eficiente adyuvante inmunológico.

Así mismo, se han realizado pruebas preliminares sobre la acción de la AVR en vacunas anti-VFA en bovinos con resultados altamente satisfactorios (Rweyemamu et al. 1985; Perez Filgueira, 1996).

1.5.4 Adyuvantes utilizados en este trabajo

Pared celular de Mycobacterium: Se ha conocido durante años la capacidad de Mycobacterium sp. de causar estimulación del sistema inmune (Adyuvante completo de

Freund (ACF), Bacillus Calmette Guerin (BCG)). Hasta hace poco tiempo fue problemático utilizar las propiedades estimulantes de productos derivados del Mycobacterium debido a los efectos colaterales nocivos de los mismos. La selección y el mejoramiento progresivo de cepas no patogénicas, junto con el desarrollo de técnicas de crecimiento y extracción química de la sustancia adyuvante, pudieron eliminar estos efectos colaterales (Vetrepharm Inc. London, Canadá).

Los fragmentos de pared celular de Mycobacterium (PCM) no causan reacciones anafilácticas, no interfieren con la prueba de derivado de proteína purificada (PPD) para tuberculosis y la frecuencia de inducción de una reacción inflamatoria localizada es de 1:1000. Estudios realizados con PCM han demostrado que este producto tiene actividad anti-tumoral y moduladora del sistema inmune (Ohta et. al., 1982), y se ha reportado que emulsiones de PCM pueden directamente activar monocitos y macrófagos (Alkemade, S., 1988).

El estudio bioquímico de PCM mostró que está compuesto por altas concentraciones de muramildipéptido, dimicolato de trehalosa y trimicolato de trehalosa, todas ellas sustancias conocidas por actuar como potentes estimulantes del sistema inmune (Alkemade, S., 1988).

Avridine: (AVR) es una amina lipoidal sintética que se caracteriza por ser inductora de interferón (IFN), IL-1 y de estimular la respuesta humoral (Roth et. al. 1985, Rweyemamu et. al., 1986).

Se ha observado una amplia actividad proliferativa de linfocitos B y T cuando se utiliza AVR, por lo que se sugiere que esta droga produce una expansión de los clones inmunoreactivos (Anderson et. al., 1983). Por otra parte se ha demostrado que la AVR activa a los macrófagos haciendo que estos secreten IFN (Niblack et. al., 1979).

Administrada por vía oral o entérica en ratones y ratas, AVR produce un importante incremento en la inmunidad de las mucosas (Rubin et. al., 1983). El agregado de la droga a células Natural Killers de bazo en ratas estimula una mayor capacidad lítica de células blanco tumorales (Jensen, 1986) lo que se interpreta como mediado por de la acción del IFN.

I.6 RESPUESTA INMUNE HUMORAL: MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DURACION DE LA RESPUESTA.

En el sistema inmune existe una continua renovación y selección de las células inmuno competentes y el número de células totales está bajo un estricto control. Las células B y T en el organismo son seleccionadas por su capacidad de reconocer al Ag. Como el número total de células es limitado, cada nuevo linfocito que se produce solo podrá

establecerse si otro muere, para ello deberá competir con otros linfocitos para poder sobrevivir y/o diferenciarse (Eigen, M. et. al., 1975). Los nuevos clones con ventajas selectivas reemplazarán a las variantes menos eficientes. La selección es mediada por receptores clonales (Ig para las células B y receptor TCR para células T) y depende de la concentración de Ag existente, de su procesamiento, afinidad y presentación (May, R.M. 1976). "El sistema inmune muestra, por lo tanto un sistema competitivo como los que han sido descritos para sistemas ecológicos" (Freitas et. al., 1993).

Uno de los pasos más importantes dados por la inmunología ha sido el entendimiento de los procesos bioquímicos y celulares involucrados en el reconocimiento del Ag por los linfocitos T. Así, en los últimos años se han realizados considerables progresos en el aprendizaje de la interacción del antígeno y las moléculas codificadas por el CMH (Ags de clase I y II). En la respuesta inmune los linfocitos T colaboradores reconocen al Ag como péptidos asociados con moléculas clase II del CMH expresado sobre la superficie de una CPA (Schwartz et. al., 1985; Büüs et. al., 1986).

De este modo mientras que el repertorio de células B para reconocer al Ag es potencialmente ilimitado, el repertorio T está limitado por la restricción del CMH (Schwartz et. al., 1985). La determinación de la estructura cristalográfica de las moléculas de HLA-A2 (CMH clase I humano) (Bjorkman et. al., 1987) ha permitido explicar mejor ésta función del CMH. Basados en la misma, Brown y colaboradores (1988) propusieron un modelo para la estructura de las moléculas de clase II, éste predice que los Ags se unen a las cadenas alfa y beta en un surco formado por 2 alfa hélices y ocho cadenas β antiparalelas. La mayoría de los residuos polimórficos entre las diferentes moléculas de clase II están localizadas dentro del canal y ellos determinan la capacidad del péptido inmunogénico de unirse a una molécula del CMH particular.

Para la producción de una respuesta primaria, entonces, es necesario que ocurran los siguientes eventos:

- Fagocitosis del Ag por macrófagos o la unión del Ag en particular por una célula B específica mediante sus inmunoglobulinas de membrana.

- Endocitosis del Ag y su procesamiento en péptidos.

- Unión de los péptidos a las moléculas de CMH II del macrófago o linfocito B y su expresión en la membrana celular para permitir la interacción CPA-células T colaboradora específica para el Ag.

- Secreción de factores de regulación por las células T para la activación de una respuesta vigorosa por parte de las células B y su posterior diferenciación a células plasmáticas.

La mayoría de las células plasmáticas son de vida corta. En relación a este tema Sprent (1994) sugiere que casi todas las células B participantes en la respuesta inmune primaria son de rápida eliminación.

La apoptosis de las células B y de su descendencia al final de la respuesta primaria está bajo el control del gen bcl-2. El rol de este gen se corroboró cuando se observó la prolongada duración de la respuesta primaria de los linfocitos B en ratones transgénicos para el gen bcl-2. La falta de este gen podría actuar aumentando la vida de las células plasmáticas prolongando la respuesta humoral resultante (Strasser et. al., 1991).

En ciertas situaciones, la repuesta inmune primaria puede continuar por semanas o meses. Esto ocurre en infecciones con microorganismos que son difíciles de erradicar una vez establecida la infección, y con Ags suspendidos en adyuvantes de liberación lenta (Sprent, 1994). En este último caso está muy bien documentado que la proliferación de los linfocitos B en los animales inmunizados se mantienen en altos niveles por un largo periodo de tiempo (Ada, 1970). En ambos casos, la síntesis de Acs se mantiene activa debido a que el sistema inmune está expuesto continuamente al Ag.

En relación a este punto, ha sido propuesto que el mantenimiento de las células de memoria y la continua producción de Acs está relacionada con la continua estimulación de las células B por el Ag (Asconas et. al. 1972; Felbush 1973; Gray et. al. 1988). Sin embargo, esta posición se encuentra bajo controversia ya que ensayos de transferencia adoptiva de células inmunocompetentes han dado evidencias que no apoyan esta teoría, demostrando que las células B pueden persistir en el nuevo huésped por más de 7 meses sin la evidencia de la presencia del Ag (Udhayakumar et. al., 1988; Schittek et. al. 1990; Sprent et. al. 1991).

La respuesta secundaria comienza con el reencuentro del Ag con los linfocitos B y T que fueron sensibilizados durante la respuesta primaria. La diferenciación de células B a plasmocitos, y la consecuente producción de Acs depende de factores liberados por las células T que fueron nuevamente activadas por CPA (Filkelman et. al., 1992).

Bajo la influencia de las interleuquinas las células B y T sufren una importante expansión, la magnitud de esta expansión depende de la concentración del Ag y de la afinidad de las células respondedoras al mismo (Gray, 1993; Mackay, 1993). Por lo tanto, el Ag es uno de los moduladores del mantenimiento de la respuesta inmune.

Para poder comprender los mecanismos involucrados en el mantenimiento de una respuesta humoral será necesario conocer los mecanismos por los cuales es posible mantener el Ag o el estímulo producto de éste, presente en el organismo.

I.6.1. Persistencia del antígeno.

La necesidad de la presencia del Ag en la iniciación de una respuesta inmune es bien conocida, sin embargo su papel en el mantenimiento y regulación de la respuesta aún no ha sido claramente establecido (Asconas et. al., 1972).

La captura y retención de complejos antígeno-Ac por las células dendríticas foliculares parece ser un factor crucial en el incremento en la producción de Acs y en la generación de las células B de memoria (Klaus et. al., 1980; Van Rooijen, 1990; Tew et. al., 1990).

Los Acs producidos en la red del complejo inmuno folicular (células B, dendríticas, Ac y Ag) están cambiando continuamente, especialmente con respecto a su afinidad. Inicialmente, los Acs poseen una baja afinidad por lo que producen una continua asociación-disociación con el Ag (Van Rooijen, 1993).

El exceso de Acs producidos durante la respuesta inmune previene la eliminación del antígeno desde los centros germinales (Hammarback and Valle, 1990). Contrariamente, la ausencia o una importante disminución de Acs circulantes en los folículos permitiría al antígeno dejar la red del complejo inmuno folicular e inducir el desarrollo de células formadoras de Acs (Van Rooijen 1990). De esta forma la presencia de antígeno resulta moduladora de la respuesta humoral producida.

1.6.2. Presencia de células presentadoras de antígeno.

Las células capaces de presentar el Ag a los linfocitos específicos en forma inmunogénica son llamadas células presentadoras de antígeno (CPA). Este grupo está compuesto por un heterogéneo grupo entre las que se hallan células de Langerhans (Streilen et. al., 1989), dendríticas (Crowley et. al., 1990; Levin et. al., 1993), células B (Vidard et. al., 1992; Liu et. al., 1993) y fagocitos mononucleares (Unanue, 1981; Casey et. al., 1990).

El proceso de PA es central en el control de la respuesta inmune siendo el que determina el nivel y el tipo de respuesta que se produce. La modulación de la función de las CPA juega un rol importantísimo en la inmunoregulación del sistema inmune. Su función en la respuesta inmune depende de la capacidad de generar señales para la estimulación de las células T. Estas señales son de dos tipos, Ag específicas y Ag inespecíficas.

La interacción del Ag, procesado en forma de péptido en el contexto de CMH II, con el TCR de un clon T específico determina la especificidad de la reacción.

Las "señales no específicas" provistas por las CPA se las puede subdividir en dos tipos:

a) Las moléculas de adhesión que facilitan la interacción física entre la CPA-células T (receptores CD4, CD8 y la familia LFA-ICAM) (Damle et.al.,1992).

b) Aquellas necesarias para la activación y división de las células T denominadas señales "coestimulantes". La IL1 producida por la CPA es el coestimulador del cual más se conoce su acción (Steinman et. al., 1980).

La interacción de ambos tipos de señales (específicas y no específicas) son suficientes para generar la activación de las células T mediante una cascada que involucra el clivaje por la Fosfolipasa C del fosfatidilinositol P2 en diacil-glicerol e Inositol P3. El Inositol P3 moviliza el Ca^{2+} intracelular produciendo la activación de la Protein-Kinasa y, como consecuencia final, la síntesis de RNA y ciertas proteínas entre ellas interleuquinas, tales como la IL 2, 4, 5 y 6. (Quiao et. al., 1992; Grimaldi et. al., 1992). Las citoquinas liberadas por las células T son capaces de regular la expresión de las moléculas de adhesión en diferentes CPA (Casey et. al., 1990).

Observaciones realizadas en las últimas dos décadas han permitido postular dos modelos clásicos para explicar las bases celulares de la respuesta humoral.

1- El modelo de activación recíproca en el cual los linfocitos B presentan el Ag a las células T colaboradoras y éstas ayudan a las células B a producir Acs específicos (Chesnut et. al., 1981; Ron et. al., 1987).

2- Un segundo modelo en el cual los macrófagos y las células dendríticas tienen un rol protagónico en el primado y mantenimiento de las células T colaboradoras mientras que la interacción célula B-célula T colaboradora específica para el Ag permite la producción de los Acs específicos (Unanue et. al., 1984; Vidard et. al., 1992; Levin et. al., 1993).

Así, independientemente del modelo postulado, la presencia de CPA es crítica para obtener una eficiente respuesta de Acs.

I.6.2.1. Presentación del antígeno por macrófagos.

Por muchos años, la presentación del Ag a células T fue considerada una función privativa del linaje monocito/macrófago debido a su capacidad fagocítica y por su batería de enzimas degradativas.

Ziegler y Unanué en el año 1981, fueron los primeros en reportar que se requiere un procesamiento activo del Ag por parte de los macrófagos para que este sea reconocido por las células T. Por otro lado, macrófagos inactivados (fijados con paraformaldehído) inmediatamente después de ser estimulados con el Ag no son capaces de activar a las células T, pero sí cuando la inactivación es efectuada a los 60 minutos, demostrando que es necesario un período de tiempo para lograr el procesamiento y presentación del Ag.

En blastogénesis realizadas con macrófagos de bazo de ratón tratados con cloroquina (un inhibidor de la proteólisis en los lisosomas) y células T específicas para Corynebacterium parvum hubo una significativa disminución en la incorporación de timidina por las células T corroborando que los macrófagos necesitan endocitar el Ag para poder actuar como una CPA (Guido et. al., 1984).

Tal lo expuesto anteriormente la PA a los linfocitos T es absolutamente dependiente de la presencia del CMH II en la superficie del macrófago. Sin embargo, la expresión del

Ag Ia (CMH II en ratón) no es constitutiva en macrófagos sino que está sujeta a una fina regulación de carácter positiva o negativa (Unanue et. al., 1984). Así, el INF γ liberado por las células T en el sitio de activación produce una regulación positiva del Ia por lo que se constituye en un sistema de retroalimentación positiva que se modifica negativamente ante la desaparición del Ag. (Unanue et. al., 1984).

I.6.2.2. Presentación del antígeno por células dendríticas.

Cuando un animal es inmunizado y sus células dendríticas son aisladas, esas células llevan el Ag en forma inmunogénica (Kyewski et. al., 1986). El Ag que es adquirido por las células dendríticas debe haber sido generado por proteólisis extracelular (Shimonkevitz et. al, 1983) o reflujo de péptidos producto de otras células dado que su actividad fagocítica es muy ineficiente. Sin embargo, otros autores (Crowley et. al., 1990) han presentado evidencias que, aunque limitadamente, las células dendríticas son capaces de endocitar y procesar el Ag. Sin embargo, la cantidad de proteína que necesita la célula para poder actuar como una CPA es muy pequeña, dato que correlaciona con la cantidad de Ag que es capaz de endocitar una célula dendrítica *in vivo*. Así, probablemente la endocitosis en las células dendríticas tiene como único fin la presentación del Ag y no el clearance de éste (Steinman et. al 1974).

I.6.2.3. Presentación del antígeno por células B

Los experimentos pioneros de Mitchison (1971) demostraron que para la colaboración entre células T y células B ambas deben reconocer parte de la misma molécula, y que las células T colaboradoras necesitan estar físicamente cercanas a las células B.

Cuando un linfocito B presenta apropiadamente el complejo CMH II-oligopéptido a una célula T colaboradora resulta una interacción estable que induce a las células T a producir IL capaces de activar la habilidad presentadora de Ag de las células B. Adicionalmente, la IL-4 y el INF γ incrementan la expresión de CMH II, aumentando así la capacidad de las células B de actuar como una CPA (Unanue et. al., 1984).

Como el número de linfocitos T y B Ag específicos es limitado antes de la primo inmunización, la probabilidad que lleguen a interactuar es muy baja. Los macrófagos y las células dendríticas tienen la posibilidad de fagocitar y presentar cualquier Ag foráneo por lo que podrían actuar en la primera fase de una respuesta inmune activando una expansión clonal de los linfocitos B y T favoreciendo entonces la interacción B-T en una respuesta secundaria (Levin et. al., 1993; Unanue et. al., 1984).

Aún no se ha aclarado si las células B presentadoras de Ag son capaces de presentar el Ag a células T nativas. La mayoría de los experimentos publicados utilizan células B que presentan el Ag a hibridomas T, células T primadas *in vivo*, pero no a células T nativas (Vidard et. al., 1992; Levin et. al., 1993). Sin embargo, Ashwell y colaboradores (1984) realizaron experimentos con ratones depletados de células B (mediante tratamiento neonatal con anti-IgM) demostrando la necesidad de las células B en el primado de las células T específicas.

Así mismo, experimentos publicados por Ron y Sprent (1987) corroboraron la necesidad de células B en el primado de células T específicas. Ellos inocularon subcutáneamente a los ratones depletados de linfocitos B (mediante Acs anti IgM) con poblaciones de linfocitos B nativos singeneicos y luego desafiaron al ratón con el Ag en ACF. El grupo de animales sin reconstituir falló en montar una respuesta proliferativa contra el Ag en ensayos de blastogénesis mientras que aquellos que recibieron las células B exógenas respondieron correctamente. Estos resultados claramente demuestran la importancia de las células B como CPA para los linfocitos T antígeno específicos.

Chesnut y Gray (1981) mediante un elegante sistema fueron los primeros en demostrar la influencia de las inmunoglobulinas (Igs) de membrana en la captación y presentación del Ag por células B. Ellos incubaron células T de ratones inmunizados con Ig de conejos, con células B de ratones vírgenes y estimularon las placas de cultivo con Igs normales de conejo o con Ig anti- Ig de ratón (producidas en conejo). Las células estimuladas con Igs normales fueron incapaces de proliferar mientras que las que fueron estimuladas con Igs anti-ratón proliferaron vigorosamente debido a que estas fueron capaces de específicamente reconocer a los linfocitos B no primados.

Los linfocitos B pueden capturar al Ag mediante pinocitosis o por medio de sus Ig de superficie, siendo la PA de 1000 a 10000 veces más eficiente si captura al Ag de esta última forma (Rock et al., 1984; Abbas et al., 1985). Estos experimentos claramente demuestran que las inmunoglobulinas de superficie están involucradas en la captación de antígeno facilitando su futura presentación a células T, y que pueden conferir una gran ventaja a los linfocitos B en su actividad presentadora con respecto a otra CPA.

I.7. Importancia de este trabajo

Como se mencionó anteriormente la vacunación es el principal medio de control de la FA. Sin embargo, las vacunas formuladas con virus inactivo inducen respuestas de AcN de corta duración siendo necesario la revacunación periódica. Por el contrario, los animales que sufren una infección desarrollan un estado inmunitario de larga duración caracterizado por altos niveles de AcN que resultan protectores contra la reinfección con el serotipo homólogo. Aunque este fenómeno es conocido desde hace tiempo, las

bases inmunológicas responsables de la prolongada inmunidad inducida luego de la infección se encuentran aún sin dilucidar.

Con la intención de comprender la causa de la prolongada respuesta inmune humoral al VFA, la primera parte de este trabajo de tesis estuvo dirigida a aclarar si el mantenimiento de los niveles de AcN puede ser explicado por un fenómeno de infección persistente del individuo (presentando un modelo de "tipo portador"), o mediante una persistencia antigénica, sin la presencia de partículas infecciosas (persistencia del antígeno mediada por CPA). La segunda parte del trabajo de tesis fue dirigida a estudiar los mecanismos de acción de dos efectivos inmunomoduladores (Avridine -AVR- y la pared de Mycobacterium -PCM) capaces de inducir una prolongada respuesta humoral en los animales inmunizados.

Como resultado global se demostró que el fenómeno de PA es el responsable de la inducción y mantenimiento de la respuesta humoral anti-VFA independientemente de la forma de inmunización utilizada (infección experimental, inmunización con diversas dosis de VI o mediante la utilización de inmunomoduladores).

OBJETIVOS

II OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

El objetivo fundamental de este trabajo de Tesis Doctoral, fue obtener una formación científica que me permita generar y llevar a buen puerto un trabajo de investigación.

En cuanto al tema específico en sí fue:

i) Estudiar los mecanismos inmunológicos que permiten la inducción y establecimiento de la prolongada respuesta inmune humoral al VFA en un modelo murino experimental.

ii) Comprender los mecanismos de acción de distintos inmunomoduladores que posibilitan la inducción de una mejor respuesta inmune al VFA.

Para poder cumplir los objetivos generales propuestos fue necesario alcanzar los siguientes objetivos parciales.

-Determinar el (o los) órgano(s) y la (o las) población(es) celular(es) que participan en la prolongada respuesta inmune humoral.

-Establecer la posible presencia de una persistente infección viral.

-Establecer la presencia e importancia de la PA en la prolongada respuesta humoral en los animales infectados.

Dado que se determinó la presencia de CPA se procedió a:

-Determinar el rol de la masa viral en la PA.

-Caracterizar la (o las) población(es) celular(es) involucrada(s) en el fenómeno de PA

-Caracterizar el efecto de distintos Inmunomoduladores en la PA.

-Determinar el rol de la PA en animales vacunados.

-Establecer la correlación *in vivo* entre la presencia de antígeno circulante y la PA en la producción de Acs contra el VFA en animales vacunados.

-Determinar el rol de la PA en la respuesta inmune a distintos antígenos definidos (péptidos sintéticos).



MATERIALES Y MÉTODOS

III MATERIALES Y METODOS

III.1 Ratones

Se utilizaron ratones lactantes y adultos de la cepa endocriada Balb/c de 60-90 días de edad del Bioterio de INTA-Castelar. También se utilizaron ratones de las cepas endocriadas, C3H del bioterio del Hospital Roffo y C57 Black, Nu/Nu y Nu/+ provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

III.2 Virus

Se utilizó VFA subtipo O1 Campos obtenido de epitelio lingual bovino con 2 pasajes posteriores en células BHK-21, perteneciente al cepario de INTA. Este se encuentra almacenado en el banco de nitrógeno líquido del laboratorio de Enfermedades Exóticas del CICV INTA-Castelar. Su título es de $10^{7,5}$ dosis letales ratón lactante 50% (DLRL50%)/ml.

III.2.1 Obtención de virus

A partir del virus semilla, se lo multiplicó el virus en frascos rodantes con monocapa de células BHK-21 realizando infecciones cortas con alta multiplicidad de infección (MI). Se inoculó 0,1 ml del virus semilla, se lo adsorbió por una hora a 37°C y, luego del agregado de medio MEM suplementado con 10% de triptosa fosfato, se dejó progresar la infección durante 5 horas para congelar los frascos a -20°C inmediatamente. A las 12 horas se descongelaron los frascos, se ajustó el pH a 7,4 y se centrifugó a 6000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 30' a 4°C para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante se separaron alícuotas para su titulación por infectividad en ratón lactante.

III.2.2 Inactivación de virus

El virus así obtenido se inactivó usando bromuro de etilenimina (BEI) (Bahnmann, 1974). Brevemente: se agregó a la suspensión viral BEI 0,1M al 1%. Se mantuvo durante 24 horas a 37°C en agitación permanente. El inactivante excedente se neutralizó con tiosulfato de sodio 0,1M al 1%. Se dejó reposar la suspensión viral por 48 horas a 4°C y luego se la centrifugó por 30' a 4°C a 6000 r.p.m.. Por último se realizó el control de inocuidad del virus inactivado mediante la inoculación i.m. de 100 ratones lactantes para descartar posible presencia de virus infectivo residual. El título viral previo a la inactivación fue siempre mayor a $10^{7,5}$ DLRL50%.

III.2.3 Purificación de virus

El virus inactivado se concentró con polietilenglicol 6000 al 7%. Se lo centrifugó a 6000 r.p.m. durante 60' a 4°C; el pellet se lo resuspendió en TrisClNa (0,02 : 0,15 M) pH 7,5; se lo clarificó 30' a 6000 r.p.m. y el sobrenadante se centrifugó a 15000 r.p.m. durante 17 horas a 4°C. Este material fue resuspendido en Tris-ClNa y se mantuvo en nitrógeno líquido hasta su purificación mediante de un gradiente preparativo de sacarosa 15-45 % p/v (40000 r.p.m., 10°C, 77'). La masa vírica obtenida se cuantificó por absorbancia a 259 nm. El material así obtenido fue utilizado para inmunizar i.p. los ratones para realizar los experimentos de reconstitución inmunológica. La misma metodología se usó para purificar al VFA activo.

III.3. Acs monoclonales utilizados

Se utilizaron los siguientes AcM:

-anti Thy 1.2	(ATCC TIB 199)	marcador de células T
-anti L3T4	(ATCC TIB 207)	marcador de células T colaboradoras
-anti LyT22	(ATCC TIB 150)	marcador de células T citotóxicas
-anti B220	(ATCC TIB 146)	marcador de células B
-anti Ag membrana	(ATCC TIB 227)	marcador de células dendríticas
-anti I-A ^d CMH class II	(MABS 6275)	marcador de células capaces de presentar antígeno

III.3.1 Obtención a partir de sobrenadante de cultivo.

Los hibridomas N° 207, 227 y 146 fueron cultivados en medio RPMI 1640 conteniendo 10% suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico y Hepes 10 mM. El agregado de Hepes permitió mantener constante el pH del medio (7,2) y aumentar sensiblemente el número de células obtenidas. Los hibridomas fueron crecidos en botellas T-75 en estufa de 37°C con 5% de CO₂. El sobrenadante de cultivo fue centrifugado a 15000 rpm por 15 minutos (para eliminar las impurezas); los clarificados fueron concentrados 10 veces por ultrafiltración mediante AMICON, y purificados mediante cromatografías de inmovinoafinidad utilizando (Proteína A, Proteína G) y mediante un tamiz molecular (Sephacryl 300).

III.3.2 Obtención a partir de líquido ascítico de ratón

Se inyectaron 10^7 células de los hibridoma N°99, N°150 por vía i.p. a ratones que habían sido inoculados 14 días antes por la misma vía con 0,2 ml de pristane (SIGMA). Se recogió posteriormente líquido ascítico de los ratones tratados y se lo congeló a -20°C . Una fracción del líquido ascítico proveniente del hibridoma N°99 se purificó por precipitación con sulfato de amonio al 50%. El precipitado se dializó contra PBS pH 8 hasta la eliminación del sulfato de amonio remanente. El precipitado se tituló por la técnica de lisis mediada por complemento utilizando células de timo de ratón como sustrato. La cuantificación de la lisis celular se determinó por la técnica de exclusión con colorante azul tripán.

La otra fracción del líquido ascítico del hibridoma N° 99 precipitado con sulfato de amonio, y el precipitado con sulfato de amonio del hibridoma 150 fueron purificados por columnas de Sephacryl 300.

Los Acs purificados fueron guardados a -20°C para ser marcados con isotiocianato de fluoresceína o utilizados en las pruebas de bloqueo de la PA.

III.4 Obtención de sueros policlonales de conejo anti-VFA O1 Campos y ovoalbúmina (OVA)

Se inocularon por vía i.m. 2 conejos con VFA inactivado y purificado y 2 conejos con OVA (SIGMA) en Adyuvante de Freund Incompleto (AFI). Los conejos recibieron reinmunizaciones a los 21 y 42 días de la primera inoculación y fueron sangrados a blanco 20 días después. Los sueros se obtuvieron incubando la sangre en placas de petri de 15 cm de diámetro durante toda la noche a 4°C . Los Acs fueron purificados mediante la utilización de columnas de Proteína G y guardados a -20°C hasta su uso.

III.5 Purificación de AcM mediante cromatografía en columnas

III.5.1 Cromatografía de inmunoafinidad (Proteína A o G)

Se sembró 2 ml de ascitis (diluido 1/4 en PBS) en la columna de Proteína A o G, se la incubó 60 minutos a temperatura ambiente, luego se la lavó con PBS (al menos tres volúmenes de columna). Se eluyeron los Acs con buffer glicina 0,1 M pH 3, recogiendo fracciones de 1 ml, siendo éstas neutralizadas (a pH 7 aproximadamente) con 100 ul de buffer Tris 0,1 M, pH 8. La cuantificación de la proteína se realizó por espectrofotómetro a 280 nm. La estimación de la concentración de inmunoglobulinas se calculó multiplicando la absorbancia leída por un factor de 0,7 (mg/ml).

III.5.2 Cromatografía de filtración (Sephacryl 300)

Para la purificación del Ac anti-Thy1.2 y anti-lyT22 (ambos ACM son IgM) se realizó cromatografía de filtración con una columna de Sephacryl 300.

Se utilizó una columna de 30 ml de capacidad y en ningún caso la cantidad de muestra sembrada superó el 5% de ese volumen. Las concentraciones de las muestras a separar fueron medidas por el método de Lowry y siempre fueron menores a los 30 mg/ml. Se utilizó buffer PBS 0,01 M pH 7 y una velocidad de corrida de 4 a 5 gotas por minuto. Las muestras se recolectaron en fracciones de 0,5 ml y fueron leídas a una absorbancia de 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70 para la estimación de la concentración protéica.

III.6 Marcación de Acs con isotiocianato de fluoresceína

Se adicionó gota a gota 50 μ l de isotiocianato de fluoresceína (disuelto en dimetil sulfóxido 1 mg/ml.) por cada ml de Ac (2 mg/ml disuelto en Carbonato de Sodio 0,1 M pH 9,0). La mezcla fue incubada a oscuras durante 8 horas en agitación y posteriormente se agregó el NH₄Cl hasta obtener una concentración final 50 mM. Después de 2 hs a 4 °C los Acs marcados fueron tratados con glicerol al 5% y separados por una columna de Sephadex 25 para eliminar la fluoresceína libre. La relación fluoresceína-proteína fue estimada midiendo la absorbancia a 495 nm y 280 nm. y en todos los casos se encontró una tasa que osciló entre 0,3 y 0,7.

III.7 Péptido 135-160 de VP1 O1C

El péptido fue producido por el método de t-Boc en un sintetizador automático Du Pount Coupler 2200. Se trabajó con la secuencia 135-160 de VP1 del VFA O1 Campos publicada por Cheung et.al., (1983).

Secuencia aminoacídica:

P1	135-160	Arg Thy Ser Arg Asn Ala Val Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Val Ala Arg Thr Leu Pro
P2	135-144	Arg Thy Ser Arg Asn Ala Val Pro Asn Val
P3	140-149	Ala Val Pro Asn Val Arg Gly Asp Leu Gln
P4	145-154	Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys
P5	150-160	Val Leu Ala Gln Lys Val Ala Arg Thr Leu Pro

III.8 Formulación de las diferentes vacunas

III.8.1 Vacuna anti-VFA

Se formularon vacunas con diferentes dosis de virus purificado e inactivado (0,5, 1,0, 5,0 y 10 µg). Las vacunas fueron emulsiones agua en aceite conteniendo el Ag en la fase acuosa (PBS), siendo la relación fase acuosa/oleosa 1:1. El volumen de inóculo fue de 0,2 ml de vacuna administrado por vía i.p.

III.8.2 Vacuna anti OVA

Se formularon con dos dosis de Ag (10 y 100 ugr de OVA). Las vacunas son agua en aceite, de igual manera que las vacunas anti-VFA.

III.8.3 Vacuna anti-péptido 135-160 de VP1 O1C

Se formularon vacunas con diferentes dosis de Ag (5, 10, 25, 50 y 100 µg.) Las vacunas son también emulsiones agua en aceite, de igual manera que las vacunas anti-VFA.

III.8.4 Vacuna anti-VFA formulada con AVR o PCM

Es ampliamente conocido el hecho de que la inmunogenicidad de cada subtipo del VFA es diferente (Perez Filgueira, 1996). Por tanto, en razón a las características de los inmunógenos utilizados, se colocaron cantidades diferentes de cada uno de los subtipos virales. Así, para el virus C3/85 se empleó una menor masa en la elaboración de las vacunas, comparado con el O1-Caseros, respetando las proporciones utilizadas a nivel industrial. Las restantes cepas fueron incluidas en concentraciones intermedias entre estas dos.

Para la formulación de las vacunas se utilizaron los subtipos de VFA O1 Caseros, C3/85, A87 y A79. Las masas antigénicas utilizadas fueron: para O1 Caseros = 0,22 ug, para C3/85 = 0,08 ug, A79 = 0,19 ug y para A87 = 0,17 ug.

Los inmunomoduladores utilizados fueron PCM (Berinstein et. al.1991) y AVR (Berinstein et. al. 1993). Las concentraciones utilizadas fueron 4 ug/dosis para PCM y 800 ug/dosis para AVR siendo adisionado a la fase oleosa de la emulsión.

III.9 Inmunización

III.9.1 Con virus infeccioso

Los ratones adultos fueron inoculados por vía i.p. con 10^4 dosis letales ratón lactante 50% (DLRL 50%) de la cepa viral O1 Campos en 0.5 ml de PBS pH 7.2.

III.9.2 Con las distintas vacunas

Ratones BALB/C fueron inoculados por vía i.p. con dosis de 0,2 ml de las diferentes preparaciones vacunales.

III.10 Extracción de sangre, obtención de plasma y suero

Los ratones adultos fueron anestesiados con éter y luego sangrados por el seno retroorbital. La sangre fue recogida en tubos heparinizados que fueron centrifugados por 5' a 1500 r.p.m. a 4°C. El plasma sobrenadante se conservó en viales a -20°C hasta su utilización.

III.11 Titulaciones

III.11.1 Titulación de virus

Las muestras fueron tituladas en ratón lactante mediante la inoculación i.m. de 0,05 ml de diluciones en base 10 de la muestra original en PBS. Cada dilución fue inoculada en una camada de 6 ratones lactantes. Los títulos se calcularon por el método de Reed y Muench a los 7 d.p.i.

III.11.2 Titulación de Acs Neutralizantes

Se empleó el método "suero fijo-virus variable" para determinar el índice seroneutralizante (ISN) en ratón lactante (Cunha et. al., 1957); se realizaron diluciones en base 10 de un stock de virus O1 Campos de título conocido. Las diluciones de virus se mezclaron en partes iguales con plasma inactivado (30' a 56°C) y diluido 1/5. La mezcla se incubó por 60' a 37°C y posteriormente a 4°C por 30'. Los ratones lactantes fueron inoculados por vía i.m. con 0,05 ml de esta mezcla. El ISN se determinó por la fórmula. $ISN = \text{Título virus} - \text{Título mezcla plasma:virus}$.

III.11.3 Titulación de Acs totales anti-virus mediante un ELISA indirecto

Se realizó un test de ELISA sandwich indirecto para la detección de los Acs anti-VFA y uno indirecto para la detección de Acs anti-péptido. Se sensibilizaron placas Inmulon II (Dynatech) de 96 pocillos con suero de captura conejo anti-VFA O1 Campos o con cada uno de los péptidos utilizados (15 ugr/ml) en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 12 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 20 (0,5%)(PBST) pH 7.4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer). Para la detección de Acs anti VFA las placas se incubaron por 45' en agitación constante a 37°C (todas las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) con una dilución apropiada de VFA en buffer de bloqueo (PBST 5% suero normal equino) (BB). Para ambos ensayos, las placas se lavaron y se las incubaron con las diluciones apropiadas, en BB, de los sueros a testear. Luego se lavaron 3 veces y se incubaron con suero anti-ratón marcado con peroxidasa (Jackson). Finalmente, las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con una solución reveladora buffer citrato-fosfato pH 5, conteniendo orthophenilene diamina dihydrochloride (OPD), H₂O₂ (3%). Se frenó la reacción con el agregado de H₂SO₄ 2,5 N y se leyeron las placas a 490 nm. Los títulos de Acs fueron expresados como el logaritmo de la inversa de la mayor dilución que duplica la absorvancia alcanzada por un grupo de sueros de animales normales

III.12 Determinación de la persistencia viral mediante

III.12.1 Cocultivo de esplenocitos con células de tiroides bovina

Las células de bazo de los animales analizados fueron obtenidas por maceración del órgano. Estas fueron entonces resuspendidas en medio 199 conteniendo 5% SFB, su viabilidad fue analizada mediante la tinción vital con azul tripan y ajustado su número a la concentración deseada. Los esplenocitos (3×10^4) fueron cocultivados con monocapas de células de tiroide bovina durante 48-72 hs. La determinación de efecto citopático se utilizó como criterio de la presencia de virus infeccioso.

III.12.2 Inoculación de macerado de células esplénicas a ratones lactantes

Esplenocitos obtenidos de la manera anteriormente descrita fueron inoculados por vía i.m. (0,05 ml) a ratones lactantes de 5-7 días de edad (Lopez et. al. 1991). El efecto viral se determinó por letalidad a los 7 d.p.i.

III.12.3 Detección de genoma viral en células esplénicas murinas mediante el ensayo de PCR.

Células de bazo (4×10^6) fueron suspendidas en 180 μ l de MEM Eagle y mezcladas con 40 μ l de proteinasa K (0.5% de SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 20 μ l de Vanadly fibrocomplex y 25 μ l de proteinasa K (2 mg/ml)) e incubado por 30 minutos a 37 °C. Luego de dos extracciones con fenol-cloroformo, los ácidos nucleicos (AN) fueron precipitado en etanol, disecados y resuspendidos en 6 μ l en agua destilada.

El método descrito por Mayer fue utilizado (Mayer et. al.; 1991) para la transcripción reversa y PCR. Un par de 20 oligonucleótidos correspondientes a las posiciones 598 y 958 del gen de la polimerasa del VFA descrito por Martínez-Salas, 1993 fue sintetizado para el uso en la reacción de PCR. El análisis del producto del PCR fue hecho en un gel de agarosa al 1.8% y corrido en buffer TBE a 150V. Bandas de 380 bases fueron visualizadas luego del tratamiento con bromuro de etidio. El Southern blot se realizó utilizando un oligonucleótido de 30 bases interno a los iniciadores marcado con digoxigenina en la región 3'. El revelado se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Boehringer- Menhein).

III.13 Preparación de suspensiones celulares

Los bazos de los animales fueron macerados entre dos portaobjetos estériles esmerilados y las células resuspendidas en medio 199 5% SFB; luego de ser lavadas 3 veces con el mismo medio, las células fueron contadas y su viabilidad cuantificada con azul tripán.

Para la obtención de células B, un total de 800×10^6 células totales de bazo se incubaron durante 60' a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en un volumen de 50 ml (10 ml por caja de Petri). Las células no adherentes del sobrenadante se lavaron una vez (por centrifugado a 1200 r.p.m.) y fueron incubadas con suero monoclonal anti-Thy lítico más complemento de cobayo 60' a 37°C. Al finalizar la reacción se lavaron las células por centrifugado y se cuantificaron en presencia de azul tripán para determinar su viabilidad.

Para la obtención de células T, se realizó primero la eliminación de células adherentes (del mismo modo que para la obtención de células B). Luego, un total de 100×10^7 células no adherentes de bazo se incubaron en columna de lana de nylon durante 60' a 37°C (Borca et. al., 1986). Las células eluidas fueron tratadas con suero de conejo anti-Ig de ratón lítico más complemento de cobayo e incubadas 60' a 37°C. Al finalizar la incubación se lavaron las células por centrifugado y se contaron en presencia de azul tripán para determinar viabilidad.

III.14 Caracterización de las poblaciones celulares

La pureza de las poblaciones celulares B y T obtenidas fue determinada por inmunofluorescencia directa. Para las células B se utilizó un suero anti-Ig de ratón (GIBCO) y para células T un suero monoclonal anti-Thy1.2; ambos acoplados a isotiocianato de fluoresceína.

Para cuantificar la proporción de células dendríticas, T colaboradoras y T citotóxicas presentes en el bazo de ratón se utilizaron los AcM purificados y marcados (ver III.3 y III.6). Brevemente, $2,5 \times 10^5$ células, suspendidas en 0,05µl de PBS pH 7,2 con 10% de SAB (Sigma) y 0,15% de azida sódica (PAA), se incubaron con igual volumen de una dilución 1/2 del suero correspondiente por 60' a 4°C (agitando cada 15'). Luego las células se lavaron por centrifugación a 1200 r.p.m. (4 veces) durante 5' y finalmente se resuspendieron en 0,2 ml de PAA. y se las observó al microscopio con luz ultravioleta. Se contaron al menos 100 células por muestra en luz visible y cuantificó las fluorescentes. La pureza se expresó como:

$$\% \text{ pureza} = (\text{Células fluorescentes} \times 100) / \text{número de células totales.}$$

III.15 Preparación de las Células Presentadoras de antígeno

Para llevar a cabo los experimentos de PA fue necesario disponer de células capaces de actuar como presentadoras de antígeno e incapaces de cumplir cualquier otro tipo de función. Para lograr este fin fueron utilizadas las siguientes técnicas:

III.15.1 Fijación de los esplenocitos con Glutaraldehído (GA)

Las células obtenidas por macerado de bazo fueron lavados 2 veces con solución salina balanceada. Luego del recuento, 5×10^6 células se fijaron con 0,05% de glutaraldehído (Sigma), durante 30 segundos a temperatura ambiente. La reacción se frenó por el agregado de un volumen semejante de lisina 0,2 M (Sigma) en PBS pH 7,4. Las células fueron entonces centrifugadas y lavadas dos veces antes de ser utilizadas.

III.15.2 Inactivación de los esplenocitos por irradiación

In vivo: Con el objeto de determinar la dosis óptima de irradiación para la obtención de CPA, tres grupos de animales dadores se irradiaron con 5,50, 6,50 y 7,00 Grys en la bomba de cobalto C4M60 de la CNEA (Ezeiza). Las células obtenidas de estos animales fueron transferidas dos días post-irradiación. Con esta metodología se obtuvieron entre 30 y 45 millones de células por animal dador.

In vitro: Para optimizar el rendimiento de células presentadoras por animal, la suspensión celular primaria fue preparada en medio RPMI 1640 conteniendo 5% SFB.

Se efectuaron tres lavados con el mismo medio inicial y la última resuspensión se realizó en medio RPMI 1640, 10% SFB. Las células fueron entonces irradiadas con 15 y 30 Grys en un Gamma Cell 220 con una fuente de cobalto 60 de 13.203 curies. De esta manera se logró obtener entre 90 y 110 millones de células por animal dador.

Todos los ensayos de PA descriptos en este trabajo de tesis fueron realizados con células irradiadas *in vitro* con 15 Grys.

III.16 Ensayos de transferencia celular

III.16.1 Transferencia de esplenocitos de animales infectados o vacunados a receptores (a) normales o (b) irradiados

a) Ratones de 60 a 90 días de edad fueron infectados o vacunados (III.9), y a distintos tiempos post-inoculación sus esplenocitos (200×10^6) fueron transferidos a receptores no tratados por vía i.p. Los niveles de Acs alcanzados se midieron a distintos tiempos post-transferencia por SN y ELISA.

b) Se transfirieron 200×10^6 esplenocitos provenientes de animales infectados (180 a 210 d.p.i) a receptores que habían sido inmunosuprimidos por irradiación (6.5 Grys por ratón) 24 hs antes de la transferencia. Como control, un grupo de 10 animales receptores fue infectado (III.9.1) y a los 7 y 12 d.p.t. Se corroboró la presencia de virus circulante y la ausencia de Acs anti-VFA mediante SN y ELISA.

III.16.2 Transferencia de CPA de animales infectados o vacunados a receptores normales o sensibilizados previamente con el virus inactivo

Se transfirieron intraperitonealmente 135×10^6 CPA (III.15.2) de animales infectados a receptores normales o a receptores presensibilizados (con 0.1, 0.5 o 1 ugr de VFA

inactivo en PBS) y cuyos títulos séricos de Acs anti-VFA se habían negativizado (se considera que un animal se negativizó cuando el título Acs por SN o por ELISA es < 1). Los niveles de Acs alcanzados a los 9 y 12 días post-transferencia (d.p.t) fueron cuantificados por SN y ELISA.

Los ensayos de transferencia de CPA de animales vacunados con las distintas formulaciones fueron realizados en receptores presensibilizados (vacunados con 0,5 ugr de VFA inactivo en PBS como vehículo) y negativizados.

III.16.3 Doble transferencias

III.16.3.1 Transferencia de esplenocitos de animales infectados o vacunados a receptores normales y las CPA de estos a receptores presensibilizados

Se inocularon por vía intraperitoneal 200×10^6 esplenocitos de animales infectados o vacunados con los distintos inmunomoduladores (90 d.p.v.) a receptores normales.

Se midieron los niveles de Acs alcanzados a los 45 y 135 d.p.t. mediante SN y ELISA. Estos receptores, a su vez, se utilizaron como dadores de CPA (150×10^6) que fueron transferidas a receptores presensibilizados y negativizados. Los niveles de AcN alcanzados a los 9 días post- transferencia fueron cuantificados mediante SN y ELISA.

III.17 Ensayos de producción e inhibición de Acs *in vitro*

La suspensión de células esplénicas fue obtenida por disrupción del órgano por medio de portaobjetos con bordes esmerilados en medio RPMI 1640 conteniendo 5% SFB y Hepes 10 mM. El agregado de Hepes permitió mantener constante el pH del medio (7,4) y aumentar sensiblemente el número de células obtenidas por órgano ya que los linfocitos murinos son muy sensibles a la alcalinización del medio, que ocurre al tomar contacto con el ambiente.

Las células obtenidas fueron lavadas (3 veces) con el mismo medio y la última resuspensión se realizó en medio RPMI 1640, 20% SFB, 10 mM Hepes, 0,1% 2-mercaptoetanol (2-ME), y 1% de antibiótico. El rendimiento habitual fue de 80 a 120×10^6 células por bazo .

Cultivo y producción de Acs *in vitro* por linfocitos murinos:

Los cultivos fueron realizadas en placas de 96 pocillos, conteniendo 250 ul de volumen final. Se realizaron pruebas manteniendo el cultivo durante diferente cantidad de días y utilizando dos diferentes concentraciones de células. Como parámetro para

seleccionar las mejores condiciones para la prueba se utilizaron la viabilidad celular y la producción de Acs específicos detectados en el sobrenadante de cultivo. Para los ensayos se utilizaron linfocitos de bazo de ratón Balb/c inoculados intraperitonealmente con 10^4 DLRL50%. Como control positivo del modelo se utilizaron linfocitos de bazo de ratón Balb/c vacunados intraperitonealmente con 10 ugr de OVA en AIF.

Se eligió la OVA como un control (+) del modelo de producción de Acs *in vitro* debido que es conocida la capacidad que posee para ser presentada eficientemente en el contexto de CMH de clase II (Vidard et. al., 1992)

Prueba de inhibición de la producción de Acs específicos mediante el bloqueo con Acs monoclonales

Se midió el efecto de varias concentraciones de AcM anti-CMH de clase II; L3T4; B220 y Thy 1.2 y Acs policlonales anti OVA y VFA en la inhibición de la producción de Acs *in vitro*. Los ratones fueron infectados con 10^4 DLRL50% o vacunados con las diferentes formulaciones. A los 90 días, las células esplénicas fueron removidas y se prepararon los cultivos celulares de la manera descrita anteriormente. Concentraciones diferentes de Acs bloqueantes fueron adicionadas en el medio de cultivo durante el primer día del ensayo. Al segundo día el medio de cultivo fue reemplazado con el objeto de eliminar el exceso de Acs bloqueantes y 5 días después se cuantificó la presencia de Acs en el sobrenadante de los cultivos mediante el ensayo de ELISA.

III.18 Ensayos de inhibición de la Presentación Antigénica *in vivo*

Se incubaron (CPA 500×10^6) (III.15.2) de animales infectados (180 d.p.i.) con un AcM anti I-A^d CMH class II (0,05 mg/ml) o con un suero anti OVA (como control)purificado por una columna de Proteína G (0,05 mg/ml).

La presencia de CPA fue determinada utilizando el método detallado en el punto III.16.2

RESULTADOS

IV RESULTADOS

IV.1 Evaluación *in vivo* de las bases celulares de la prolongada respuesta inmune humoral en animales experimentales infectados o inmunizados con virus inactivo purificado (VI).

IV.1.1 Evaluación del (o los) órgano(s) involucrado(s) en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune humoral inducida durante la infección con VFA.

Con el fin de evaluar el o los órganos linfoides involucrados en la producción de la respuesta inmune humoral en animales infectados con VFA, se infectaron ratones adultos Balb/c y a los 90 d.p.i. se midió el ISN. Las células de bazo, hígado, ganglios inguinales y las combinatorias de éstas fueron transferidas a animales receptores normales, y a los 60 días post transferencia (d.p.t.) se determinó su ISN (figura 3).

Solamente los animales que recibieron las células provenientes del bazo fueron capaces de inducir una respuesta detectable de AcN (tabla 1).

Figura 3

Esquema de transferencia celular para la evaluación de la prolongada respuesta humoral al VFA

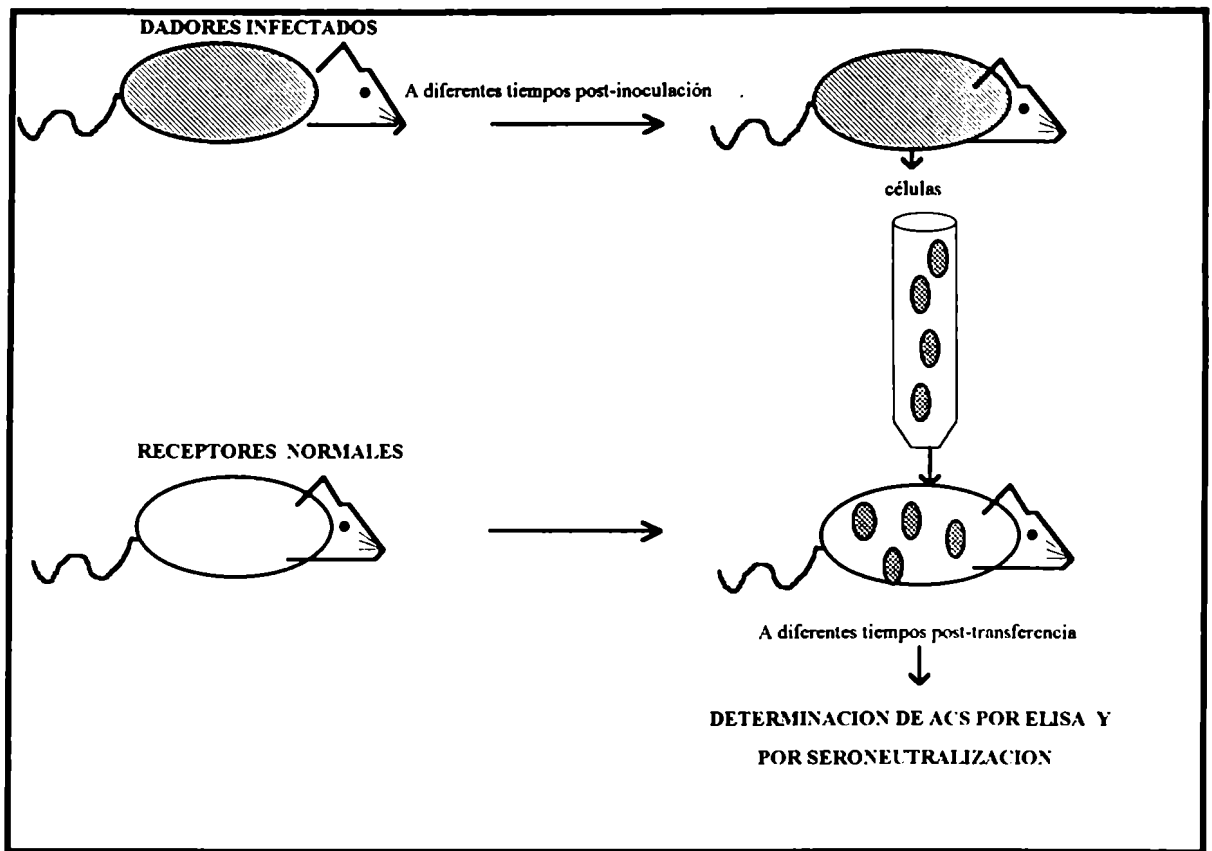


Tabla 1 Acs neutralizantes inducidos en receptores normales

Células provenientes de dadores infectados				Título de AcN inducidos	
Grupo	Bazo	Ganglio	Hígado	ISN	DS
1	140 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶	2,70	0,30
2	200 x 10 ⁶	-----	-----	3,50	0,45
3	-----	200 x 10 ⁶	-----	0,25	0,10
4	-----	-----	200 x 10 ⁶	0,30	0,10
5	100 x 10 ⁶	95 x 10 ⁶	-----	2,00	0,35
6	100 x 10 ⁶	-----	100 x 10 ⁶	1,85	0,30
7	-----	150 x 10 ⁶	-----	0,25	0,20

Células provenientes de animales normales				Título de AcN inducidos	
Grupo	Bazo	Ganglio	Hígado	ISN	DS
control (-)	140 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶	30 x 10 ⁶	0,30	0,15

Ratones Balb/c no tratados recibieron i.p. células de distintos órganos provenientes de animales infectados (ISN de los dadores 4.2). A los 60 d.p.t. se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinó su ISN. Los valores de la tabla corresponden al promedio de las 3 mediciones. El DS fue siempre inferior a 0,40 en todos los grupos experimentales.

IV.1.2 Caracterización de las células de bazo utilizadas en los experimentos de transferencia de células esplénicas.

Tabla 2 Caracterización fenotípica (por inmunofluorescencia) de las células de bazo de animales a los 90 días post-infección

Acs marcados	%	DS
anti - células B (anti B220)	27,0	1,17
anti - células T (anti Thy 1.2)	28,3	1,90
anti - células T colaboradoras (anti L3T4)	17,0	1,37
anti - células T citotóxicas (anti Ly T22)	14,0	1,13
anti - células dendríticas	3,2	0,95
anti - IG de ratón	29,4	1,03

Células de bazo (2.5×10^5) provenientes de animales infectados fueron caracterizadas utilizando los diferentes AcM marcados con FICT. Se cuantificaron la cantidad de células fluorescentes correspondientes a un total de al menos 100 células observadas con luz visible. La pureza se expresó como:

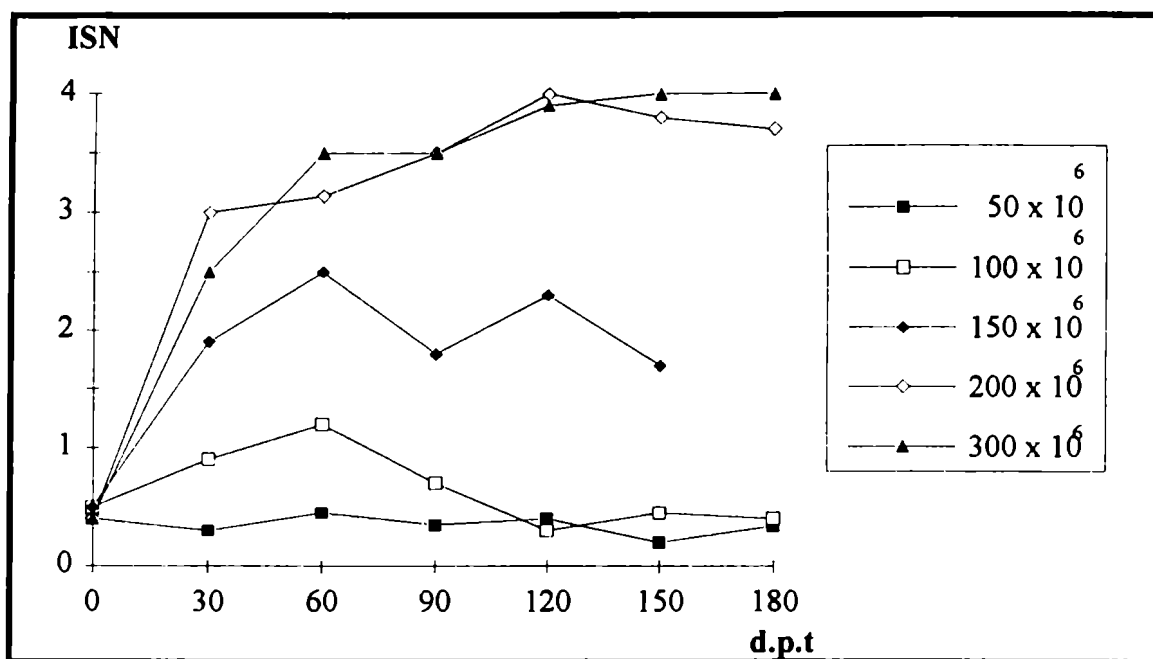
$$\% \text{ pureza} = (\text{número de células fluorescentes} / \text{número de células totales}) \times 100.$$

IV.1.3 Evaluación del número óptimo de esplenocitos provenientes de dadores infectados necesarios para inducir una prolongada respuesta humoral en un receptor normal

Para optimizar el número de células en los futuros ensayos de transferencia, se estudió la respuesta de AcN inducidos en los receptores normales luego de ser transferidos con 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 , 200×10^6 y 300×10^6 esplenocitos provenientes de animales infectados (90 d.p.i.) (figura 4). Tanto 200×10^6 como 300×10^6 células indujeron una respuesta de AcN elevada hasta el final del experimento (día 180 p.t.). Los animales que recibieron 150×10^6 células presentaron una respuesta de AcN menor mientras que aquellos receptores que recibieron cantidades inferiores a 150×10^6 no

mostraron títulos detectables de Acs. Se eligió 200×10^6 como el número óptimo de células a utilizar en los siguientes experimentos.

Figura 4 Transferecia de distinto número de esplenocitos de dadores infectados a receptores normales



Ratones Balb/c recibieron i.p. distintas cantidades de esplenocitos provenientes de dadores infectados. A diferentes d.p.t. se obtuvieron muestras de plasma de 4 animales por grupo y se determinó el ISN. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones. El DS fue siempre inferior a 0,40 en todos los grupos experimentales.

IV.1.4 Efecto de la antigüedad de la respuesta inmune en la capacidad de esplenocitos provenientes de dadores infectados en inducir Acs en receptores normales

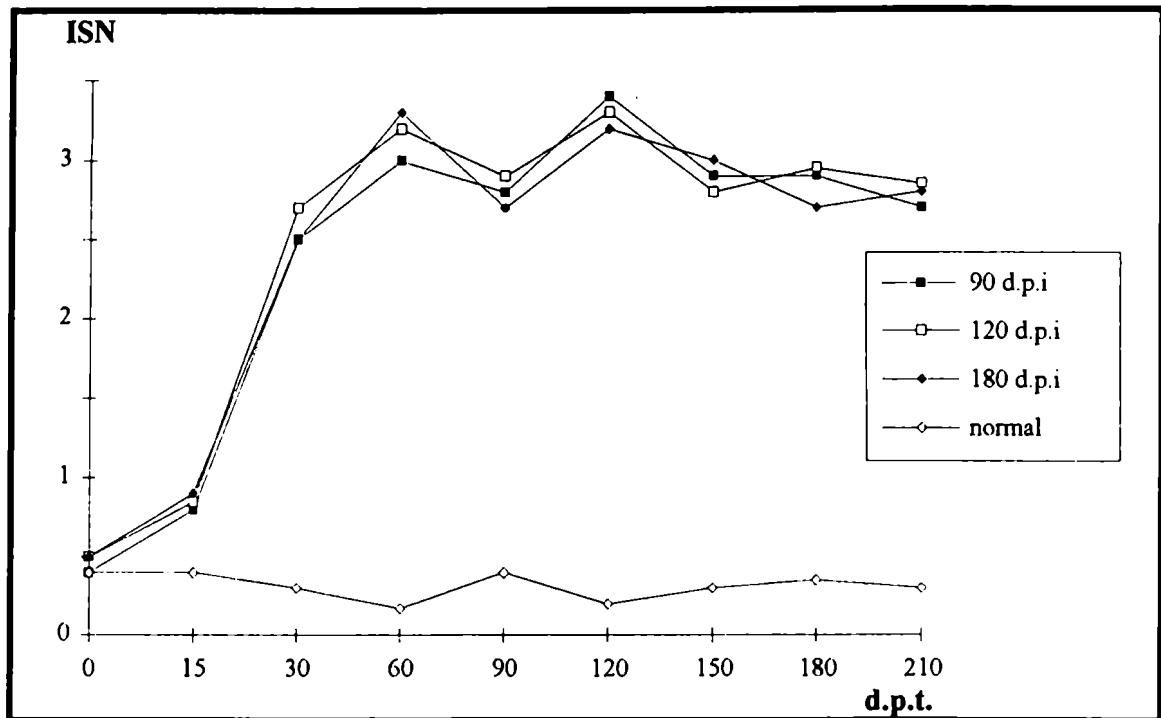
Se transfirieron esplenocitos a los 90, 120 y 180 días post-infección a receptores normales con el fin de analizar la capacidad de inducir AcN en el nuevo huésped.

Los receptores montaron una significativa respuesta de AcN que fue detectada recién a los 30 d.p.t y que se prolongó hasta el día 210 (tiempo que duró el experimento) sin que haya diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (figura 5).

De hecho, las células transferidas fueron capaces de inducir en los receptores una respuesta similar a la que se desarrolla en un ratón virgen que es infectado con VFA.

Figura 5

Transferencia de células provenientes de dadores infectados a distintos d.p.i. a receptores normales



Ratones Balb/c vírgenes recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos obtenidos de dadores a distintos tiempos post-infección. A diferentes d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 receptores por grupo y se determinó el ISN. Cada punto corresponde al promedio de 3 mediciones y el DS fue siempre inferior a 0,35.

IV.1.5 Evaluación de la capacidad de dadores inmunizados con diferentes vacunas en la inducción de una respuesta humoral en receptores normales

IV.1.5.1 Transferencia de esplenocitos provenientes de dadores inmunizados con distintas dosis de virus inactivado

Para analizar si el fenómeno de transferencia de la respuesta inmune era dependiente de la presencia de la replicación viral en el dador, células de bazo de animales vacunados 60 días antes con 0,1, 1 y 10 ugr de VI en PBS o AIF fueron transferidas a receptores normales (figura 6 A y B).

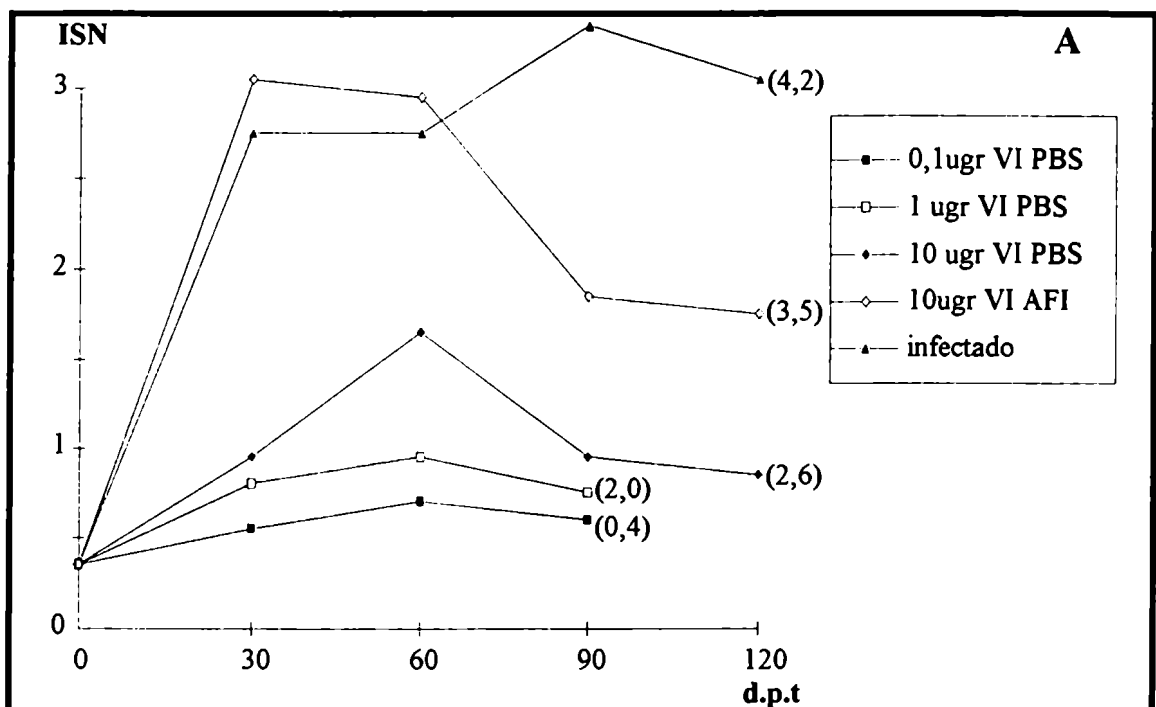
Los resultados demuestran que el VI es tan eficiente como el virus activo en la sensibilización de las células dadoras, por lo que el virus infeccioso no sería el responsable de la respuesta de AcN en los receptores.

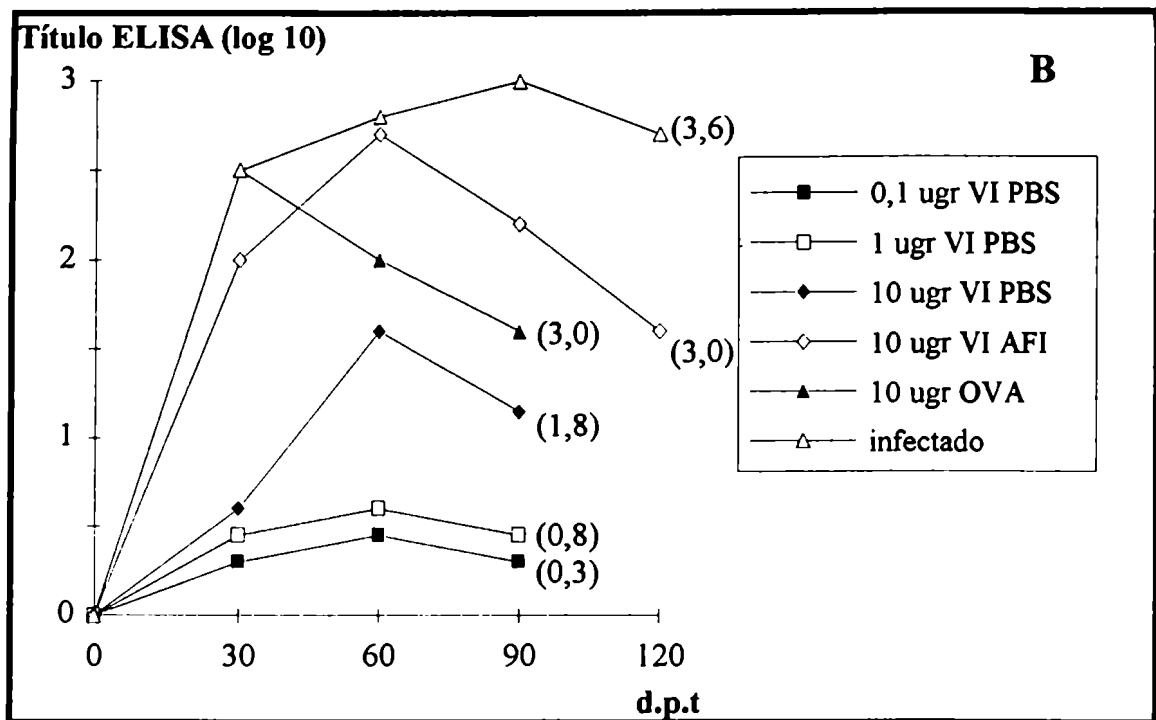
Es importante destacar que la respuesta de AcN anti-VFA obtenida en los receptores correlacionó con los títulos de AcN de los animales dadores.

Como un segundo método de detección de Acs anti-aftosa, los sueros fueron también analizados por ELISA. Los títulos de ELISA correlacionaron con los hallados por S.N.

Para corroborar la eficiencia del sistema de transferencia utilizado, se incluyó a OVA como un antígeno control. La respuesta humoral inducida por el virus activo y el virus inactivo fue similar a la de la OVA, que es una proteína bien descripta como inductora de respuesta de memoria y PA (Vidard, et. al., 1992).

Figura 6 A y B: Transferencia de esplenocitos de animales infectados o vacunados a receptores normales





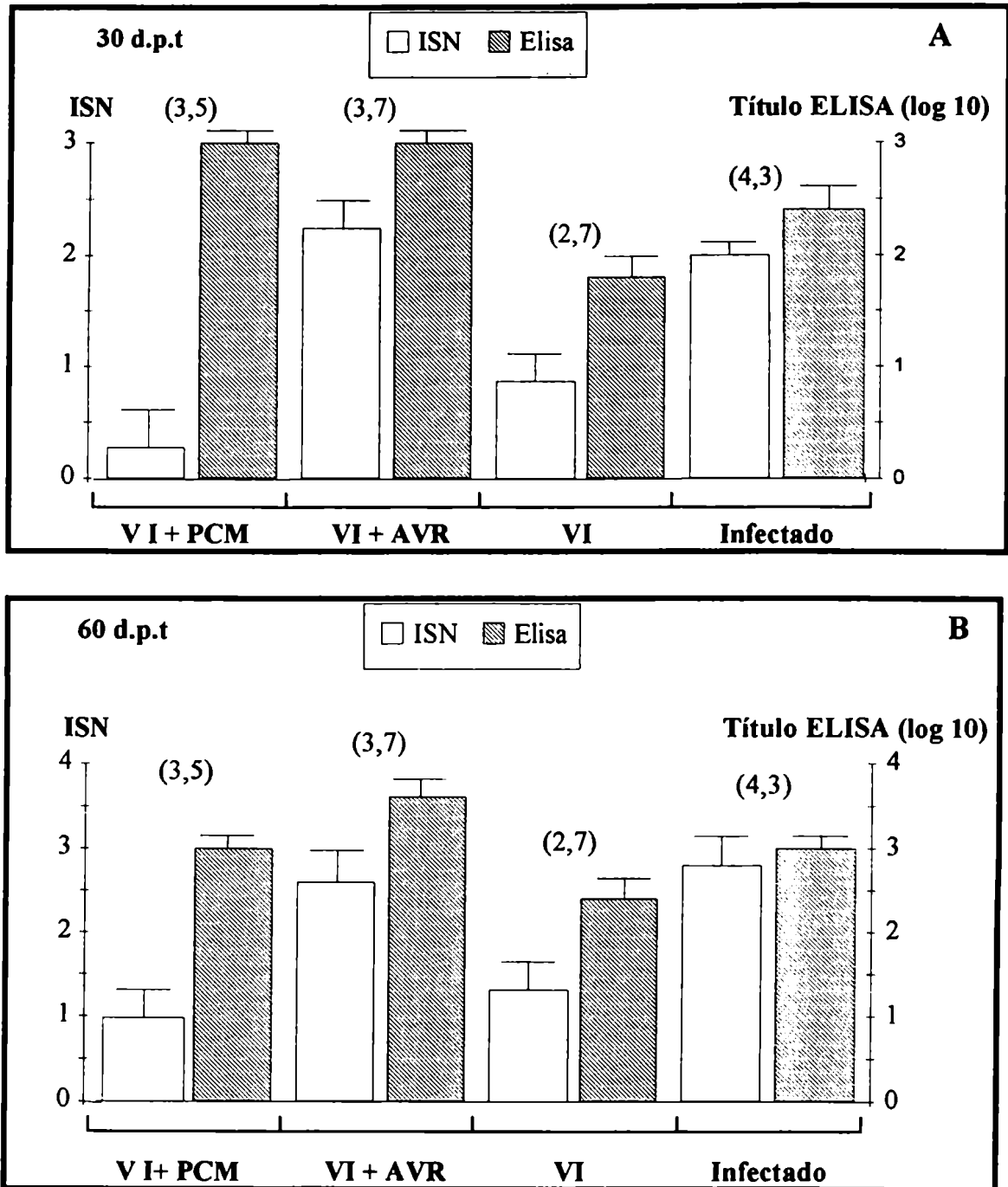
Ratones Balb/c vírgenes recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos de dadores infectados, vacunados con 10 ugr de OVA en AIF, o inmunizados con distintas concentraciones de VI en PBS o AIF. A diferentes d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 receptores por grupo y se determinó el ISN (figura A) y los Acs anti-VFA y anti OVA por ELISA (figura B). Cada punto representa al promedio de 3 mediciones. En la figura A el DS fue siempre inferior a 0,35, mientras que para la figura B el DS fue siempre inferior a 0,20. Los valores entre paréntesis corresponden a los títulos de Acs de los animales dadores a los 60 d.p.v.

IV.1.5.2 Transferencia de esplenocitos de dadores inmunizados con vacunas formuladas con diferentes inmunomoduladores

Con el fin de analizar la influencia de diferentes inmunomoduladores en la formulación de vacunas que utilizan VI como antígeno, células de bazo de animales vacunados con VI + AVR, VI + PCM y VI (sin el agregado de inmunomodulador) en el vehículo oleoso fueron transferidos a receptores normales.

Las células de animales inmunizados con VI + AVR indujeron Acs anti-VFA detectados por ELISA y SN en los receptores normales de igual forma que los esplenocitos de animales infectados. Los animales que recibieron las células de los animales vacunados con VI + PCM o el VI en vehículo oleoso, llamativamente sólo produjeron altos títulos de Acs anti-VFA detectables por ELISA mientras que la respuesta de AcN lindó con los valores basales (figura 7 A y 7 B).

Figura 7 (A y B) Transferencia de esplenocitos de animales infectados o inmunizados con vacunas inmunomoduladas a receptores normales



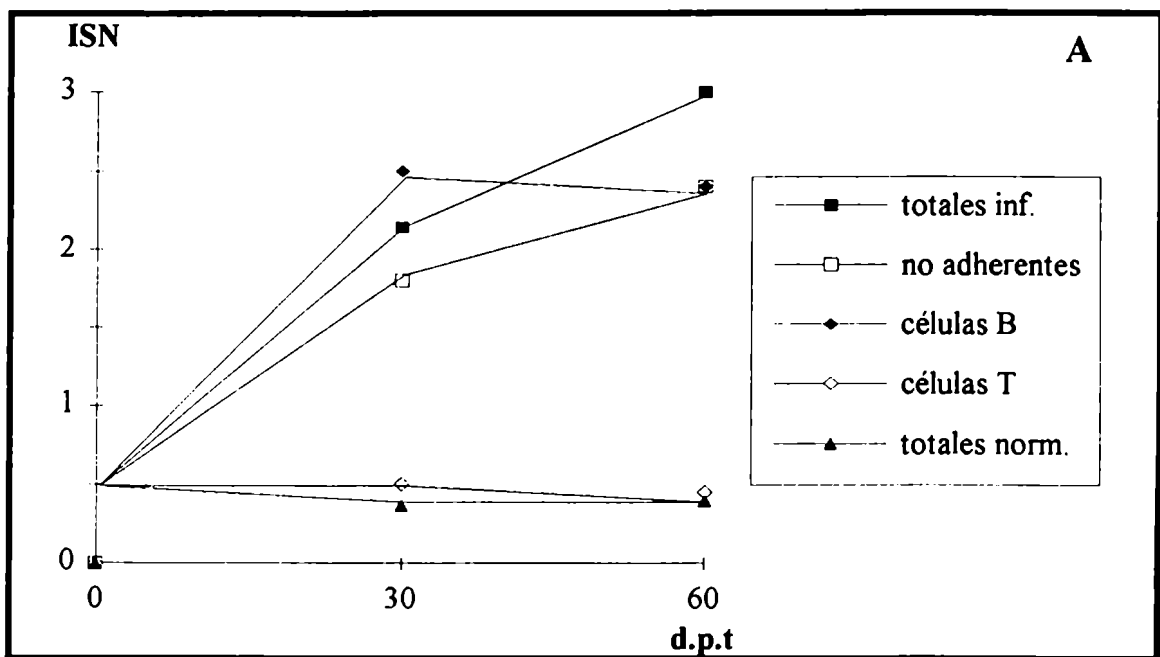
Ratones Balb/c fueron inmunizados con diferentes formulaciones y a los 60 d.p.i 200×10^6 esplenocitos fueron transferidos a receptores normales. A los 30 (A) y 60 (B) d.p.t. se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo. Cada muestra de plasma se analizó por S.N. y ELISA.

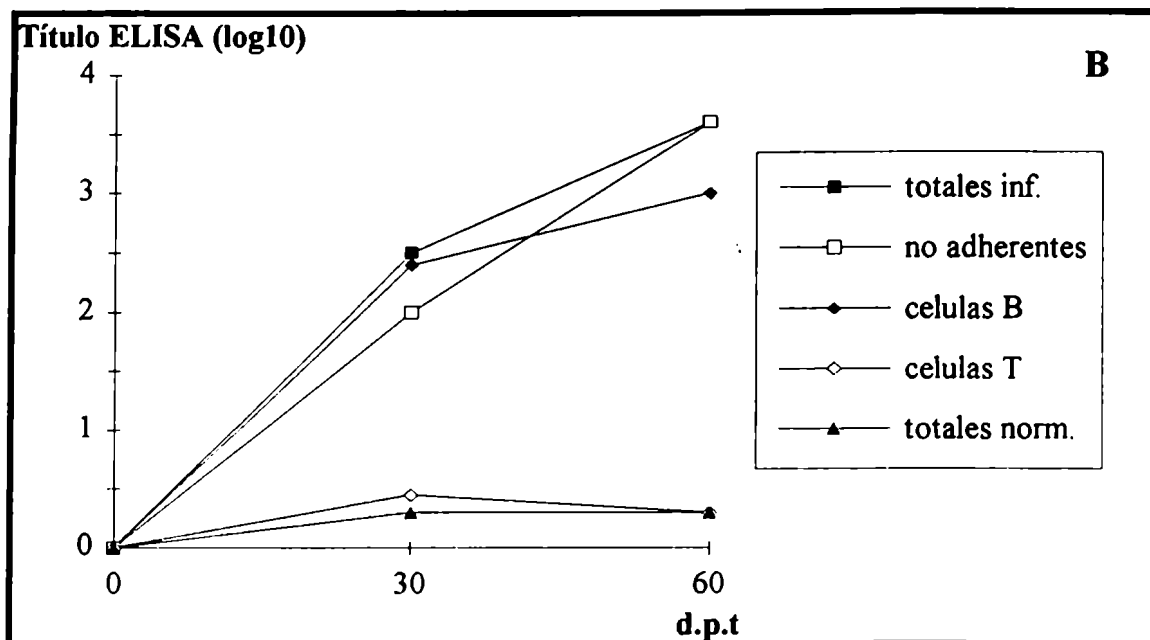
IV.2 Identificación de los tipos celulares involucrados en la transferencia de la respuesta humoral en dadores infectados

Para identificar el tipo celular responsable de la transferencia de la respuesta inmune a los receptores normales se transfirieron poblaciones celulares altamente enriquecidas de células no adherentes, células B y células T.

Mientras las células no adherentes y las células B indujeron una respuesta semejante a las células totales de bazo, los linfocitos T purificados fueron completamente ineficientes; por lo tanto, los linfocitos B resultaron ser suficientes para la inducción de Acs en los receptores normales (figura 8).

Figura 8 (A y B) Transferencia de células no adherentes, células B y células T de dadores infectados a receptores normales





Grupos de ratones Balb/c vírgenes recibieron i.p. esplenocitos de dadores infectados (200×10^6), células no adherentes (130×10^6), células B (95% de pureza) (95×10^6) o con células T (94% de pureza) (95×10^6), respectivamente. A diferentes d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 receptores por grupo y se determinó el ISN (figura A), y los Acs anti-VFA por ELISA (figura B). En la figura A el DS fue siempre inferior a 0,35, mientras que para la figura B el DS fue siempre inferior a 0,20.

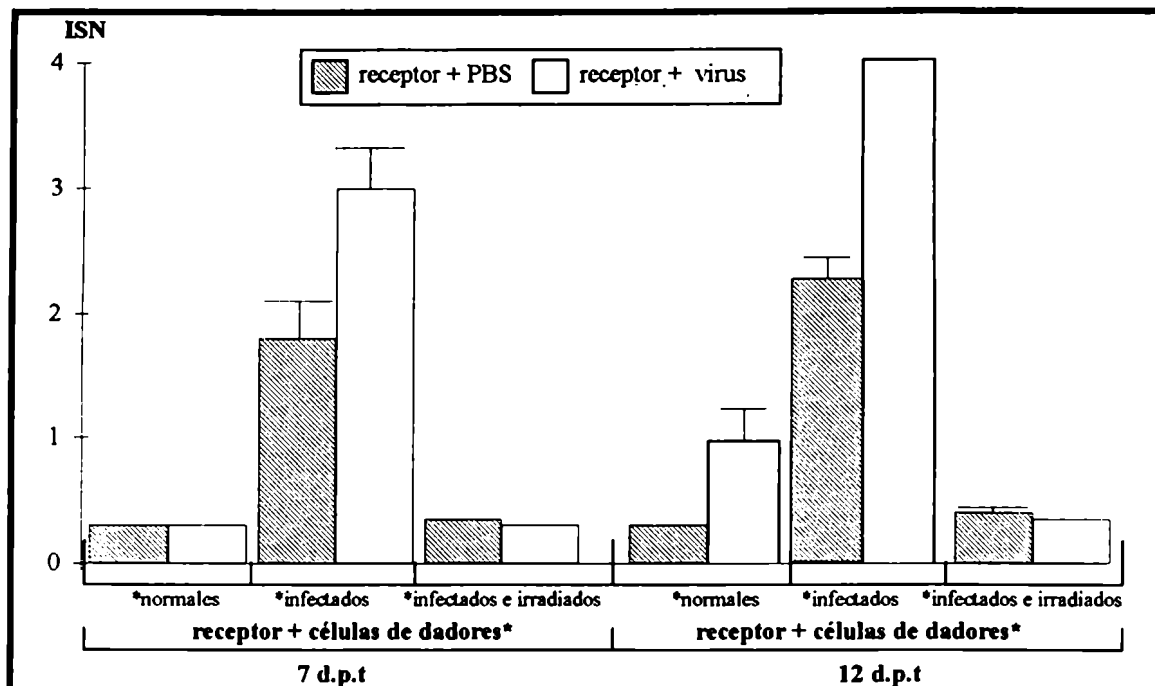
IV.2.1 Papel de las células plasmáticas en la transferencia de la respuesta humoral

Ya que los linfocitos B son sensibles a la irradiación (Ruhl, et. al., 1973) y que las células plasmáticas son resistentes a ésta (Blazck, 1976, Dobranova, et. al., 1983), se utilizó esta característica para evaluar el papel de los plasmocitos en la prolongada inducción de Acs en los receptores.

La transferencia de esplenocitos provenientes de dadores infectados indujo una respuesta humoral en los animales receptores irradiados. Dicha respuesta se incrementó cuando se adicionó virus en los animales receptores, lo que demostró que entre los esplenocitos transferidos existen células B que son capaces de diferenciarse a células plasmáticas (figura 9). Además, la transferencia de esplenocitos irradiados fue incapaz de inducir Acs en ambos grupos (el grupo que recibió los linfocitos irradiados + PBS y el que recibió los linfocitos irradiados + virus) (figura 9) demostrando que los Acs inducidos en los animales receptores son la consecuencia de la diferenciación de células B a células plasmáticas y no el producto de las células plasmáticas transferidas.

Figura 9

Transferencia de esplenocitos provenientes de dadores infectados o infectados e irradiados a animales receptores irradiados



Ratones Balb/c irradiados recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos provenientes de dadores normales, infectados o infectados e irradiados. Cada grupo de animales receptores fue dividido en dos y se les inoculó i.p. virus o PBS (como control). A los 7 y 12 d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinó el ISN. Cada punto corresponde al promedio de 3 mediciones.

IV.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida en ensayos de transferencia de esplenocitos utilizando ratones con diferentes haplotipos.

Con el objeto de determinar si diferentes CMH de clase II pueden afectar la inducción de Acs en los animales receptores normales se evaluó la respuesta humoral inducida en ratones C3H y C57 Blacks (haplotipo k/k y b/b respectivamente) a distintos d.p.t. Los animales receptores fueron transferidos con esplenocitos provenientes de animales infectados, vacunados con 10 ugr de VI en vehículo oleoso, 10 ugr de OVA en el mismo vehículo o con células de animales no tratados, como control negativo. Como fue mencionado anteriormente la OVA fue utilizada como control positivo debido a que se ha demostrado que esta proteína es presentada muy eficientemente en el contexto de CMH de clase II (Vidard, et. al., 1992) (figura 10 A y B).

Los resultados demuestran que la inducción de Acs en el modelo experimental no es dependiente del haplotipo.

Figura 10 A Transferencia de esplenocitos provenientes de animales C3H infectados, o vacunados con diferentes formulaciones, a animales receptores C3H normales

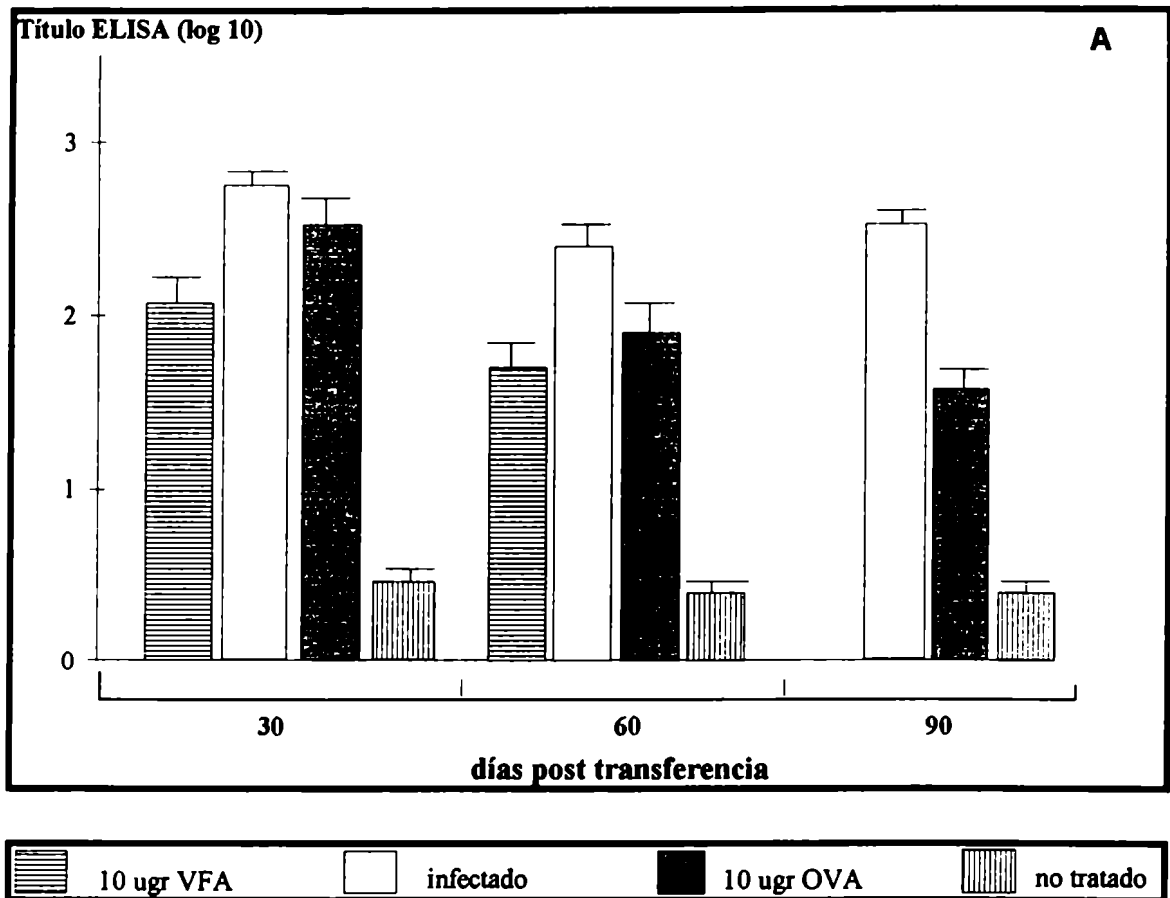
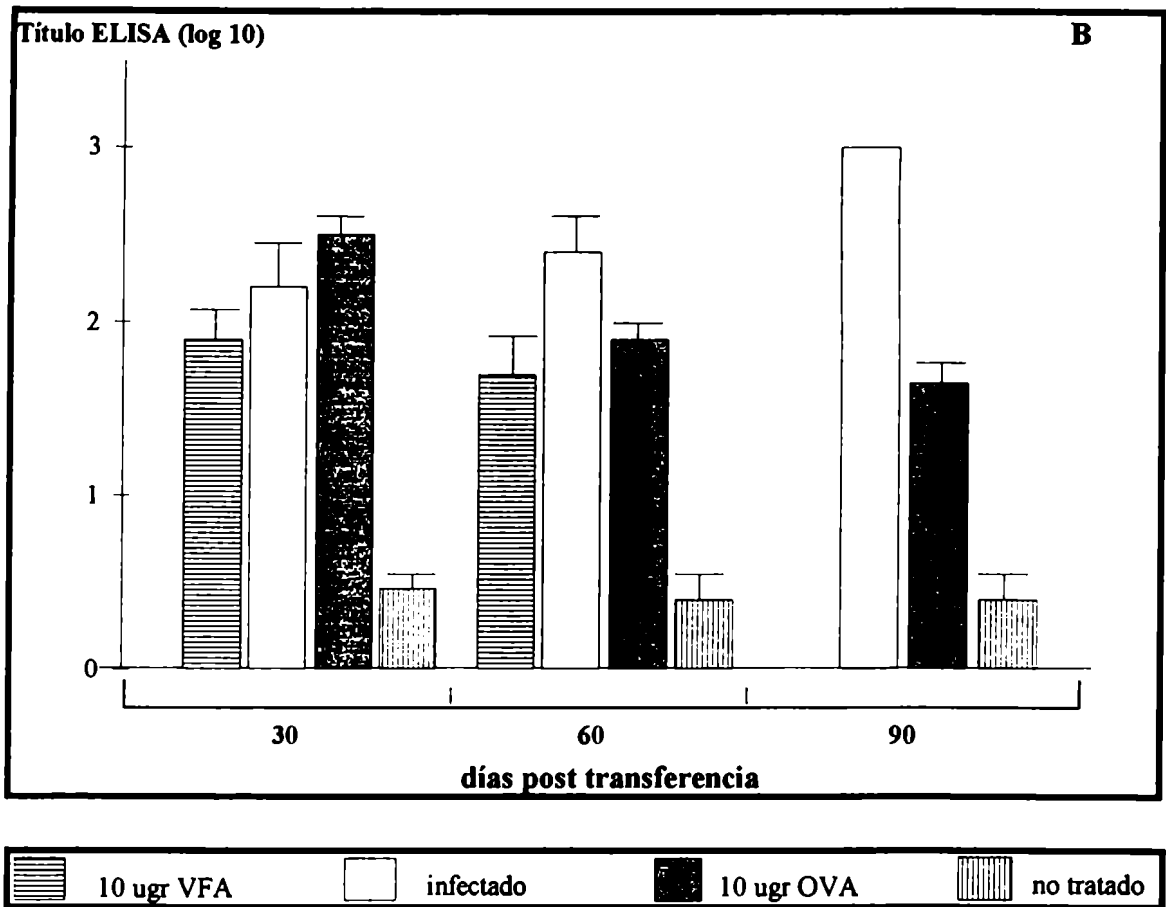


Figura 10 B Transferencia de esplenocitos de animales C57 Black infectados, o vacunados con diferentes formulaciones, a animales receptores C57 Black normales



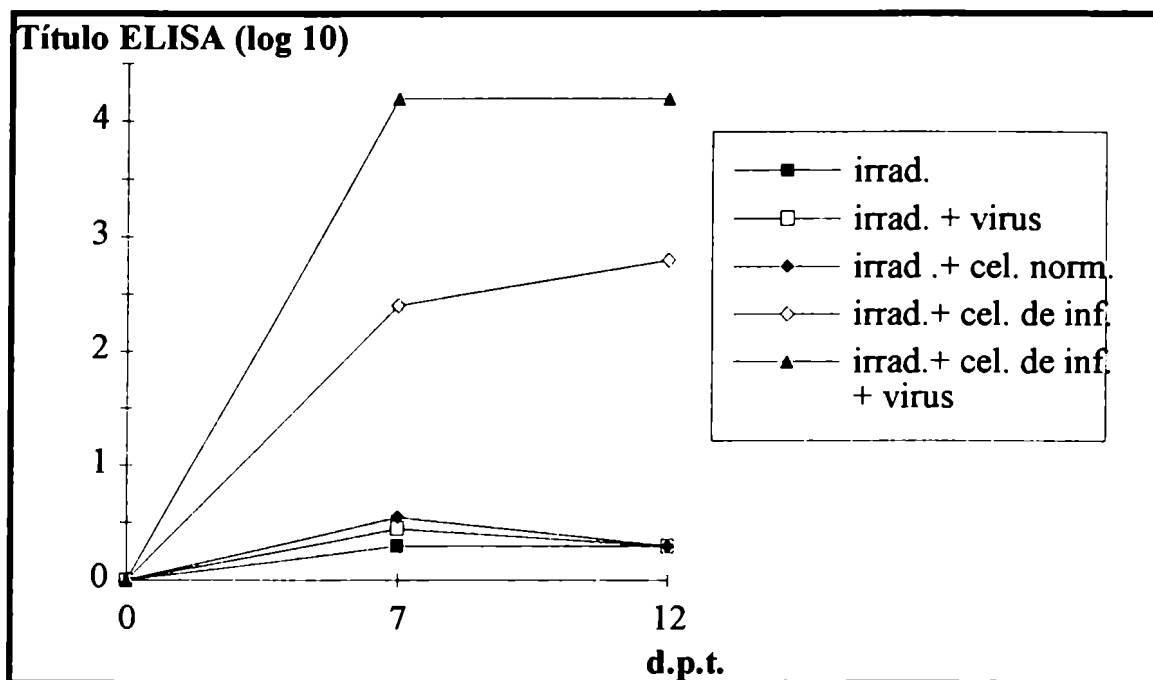
Ratones vírgenes C3H y C57 Blacks recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos provenientes de dadores singenéticos infectados, vacunados con 10 ugr de VI en AFI o inmunizados con 10 ugr de OVA en AFI. A diferentes d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales receptores por grupo y se determinó por ELISA los Acs anti-VFA y anti-OVA.

IV.4 Evaluación del papel del sistema inmune de los animales receptores en la respuesta humoral inducida post-transferencia

Con el fin de determinar si el sistema inmune de los animales receptores era fundamental en la inducción de Acs post-transferencia, se transfirieron esplenocitos de animales infectados a animales receptores que habían sido inmunosuprimidos previamente mediante irradiación.

Los esplenocitos provenientes de los animales infectados fueron capaces de inducir una clara respuesta humoral en los receptores irradiados (figura 11). Estos resultados indican que las células del donante son suficientes para el establecimiento del fenómeno en el receptor.

Figura 11 Transferencia de esplenocitos obtenidos de dadores infectados a animales receptores irradiados



Ratones Balb/c fueron irradiados con 6.5 gryS 24 hs antes de ser transferidos con 200×10^6 esplenocitos provenientes de animales infectados (180 a 210 d.p.i)

Un grupo de 10 animales receptores fue infectado (—□—) como control de inmunosupresión. A los 7 y 12 d.p.t. se midieron los Acs anti-VFA por ELISA. Los resultados corresponden al promedio de 3 animales de dos ensayos independientes. El DS fue siempre inferior a 0,25 en todos los casos.

IV.5 Estudio de la persistencia viral como posible causa de la prolongada respuesta inmune humoral en los animales receptores

La duración de la respuesta humoral luego de la infección viral con VFA es prolongada a diferencia a la inducida por vacunas convencionales con VI que son significativamente más cortas.

Con el fin de determinar si la persistencia viral era el mecanismo por el cual los animales receptores (de esplenocitos provenientes de animales infectados) inducen una

respuesta humoral por más de 360 d.p.t., se realizaron experimentos cuyo objetivo fue el de detectar la posible presencia de virus infeccioso en las células transferidas.

Cocultivo de esplenocitos con células sensibles al VFA (BHK y de tiroides bovina)

Se cultivaron esplenocitos provenientes de ratones previamente infectados (30, 60 y 90 d.p.i) con células BHK 21 y con cultivos primario de tiroide bovina. Se realizaron dos pasajes ciegos con los sobrenadantes de cultivo, sin embargo, en ningún caso fue posible detectar la presencia de virus infectivo. Como control positivo se utilizó esplenocitos de dadores infectados 24 hs antes.

Inoculación de macerado de células esplénicas provenientes de animales infectados a ratones lactantes

Se inoculó i.m. un macerado de células de bazo de animales infectados (30, 60 y 90 d.p.i) a 96 ratones lactantes de 5 a 7 días de edad . El efecto viral se determinó por letalidad a los 7 d.p.i. En ningún caso fue posible detectar presencia de virus infectivo.

IV.6 Detección de la presencia de genoma viral en los esplenocitos utilizadas en las transferencias

Para corroborar los resultados descriptos anteriormente se trató de detectar la presencia de genoma viral mediante PCR en los esplenocitos de los animales infectados que fueron utilizados como dadores en los ensayos de transferencia.

El ensayo de RT-PCR utilizado resultó 2 logaritmos más sensible que la detección de virus infeccioso mediante la inoculación de ratones lactantes. Los resultados demostraron que, con la sensibilidad de la prueba, no fue posible detectar genoma viral en los esplenocitos de dadores infectados.

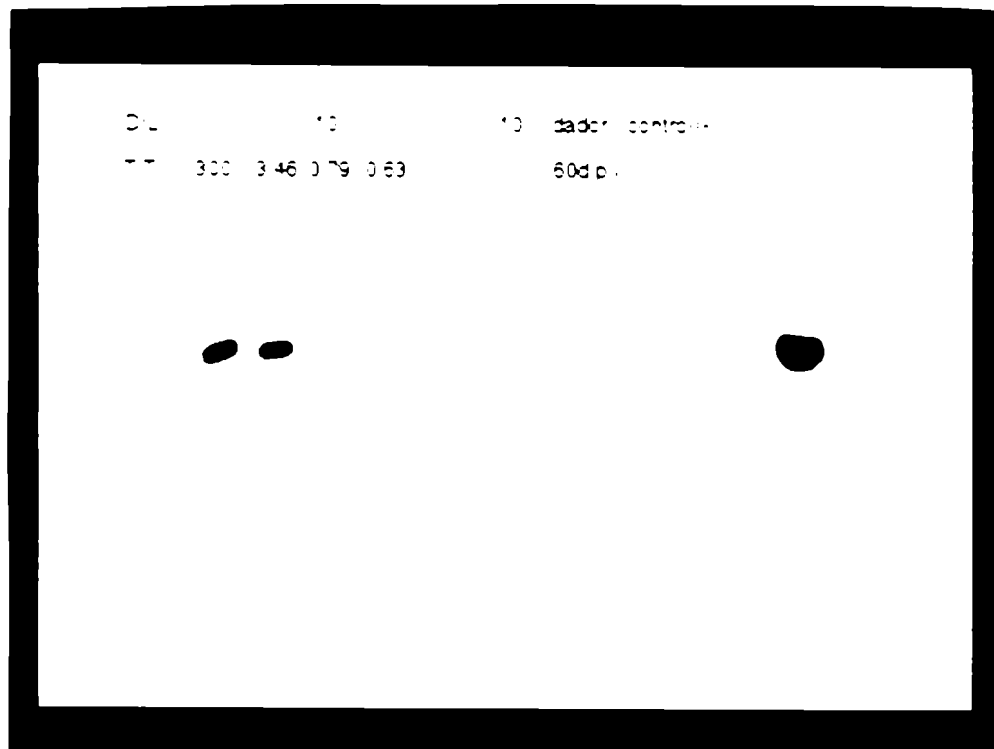
Tabla 3 A Sensibilidad del ensayo de detección de genoma viral por PCR.

Dilución de virus infectivo	DLRL50%	PCR
10	0,79	(+)
10 ⁻¹	0,63	(+)
10 ⁻²	(-)	(+)
10 ⁻³	(-)	(+)
10 ⁻⁴	(-)	(-)

Tabla 3 B Detección del RNA viral en esplenocitos de animales infectados

Células de:	DLRL 50%	P.C.R.
ratón infectado (1 d.p.i)	(+)	(+)
ratón normal	(-)	(-)
ratón infectado (30 d.p.i)	(-)	(-)

Visualización de las bandas amplificadas mediante Souther blot



IV.7 Evaluación del papel de la Presentación Antigénica en la inducción y mantenimiento de la respuesta humoral en animales infectados

Habiéndose descartado que la prolongada respuesta humoral inducida por los esplenocitos de animales infectados en los animales receptores es debida a una infección persistente, se decidió estudiar el fenómeno de PA y su posible papel en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune.

IV.7.1 Detección de células presentadoras de antígeno específicas para el VFA en el bazo de animales infectados

En primer lugar fue necesario desarrollar una metodología que permitiese detectar la presencia de células CPA. Basicamente, se realizó una transferencia de esplenocitos irradiados o fijados provenientes de animales infectados (un sistema en donde supuestamente se encontraban presentes las CPA) a animales receptores normales con el fin de inducir una respuesta primaria. La falta de esta respuesta llevó a utilizar animales receptores presensibilizados (vacunados y negativizados), de manera que la respuesta ante la potencial presencia de epitopes del VFA en las células donantes, fuera más rápida y potente que la inducida en la respuesta primaria.

La fijación con glutaraldehído o irradiación de los esplenocitos permitió evitar que las células de los animales donantes reaccionen produciendo Acs anti-VFA (Acs que podrían ser confundidos con la respuesta inducida en los animales receptores) (figura 12).

En estos experimentos el animal receptor actúa como un sistema revelador, si se detectan Acs anti-VFA implica que el antígeno fue presentado por las células transferidas.

Se estandarizó la dosis de virus inactivo necesaria en los animales receptores de manera que los animales se encuentren sensibilizados ante el virus pero sus niveles de Acs hayan descendido a niveles basales (para evitar que los anticuerpos previos a la transferencia no sean confundidos con los inducidos por las CPA) (figura 13).

Debido al bajo rendimiento de CPA obtenidas cuando se irradian los animales dadores se procedió a irradiar los esplenocitos de los animales dadores *in vitro* (figura 14), lográndose reducir en un 300 % el número de animales dadores necesarios.

La mayor sensibilidad fue obtenida cuando se irradiaron *in vitro* los esplenocitos con 15 Gry y se utilizaron animales receptores vacunados con 0,5 ugr de VI en PBS (Tabla 4).

Figura 12

Ensayo de Presentación Antigénica: irradiación *in vivo*

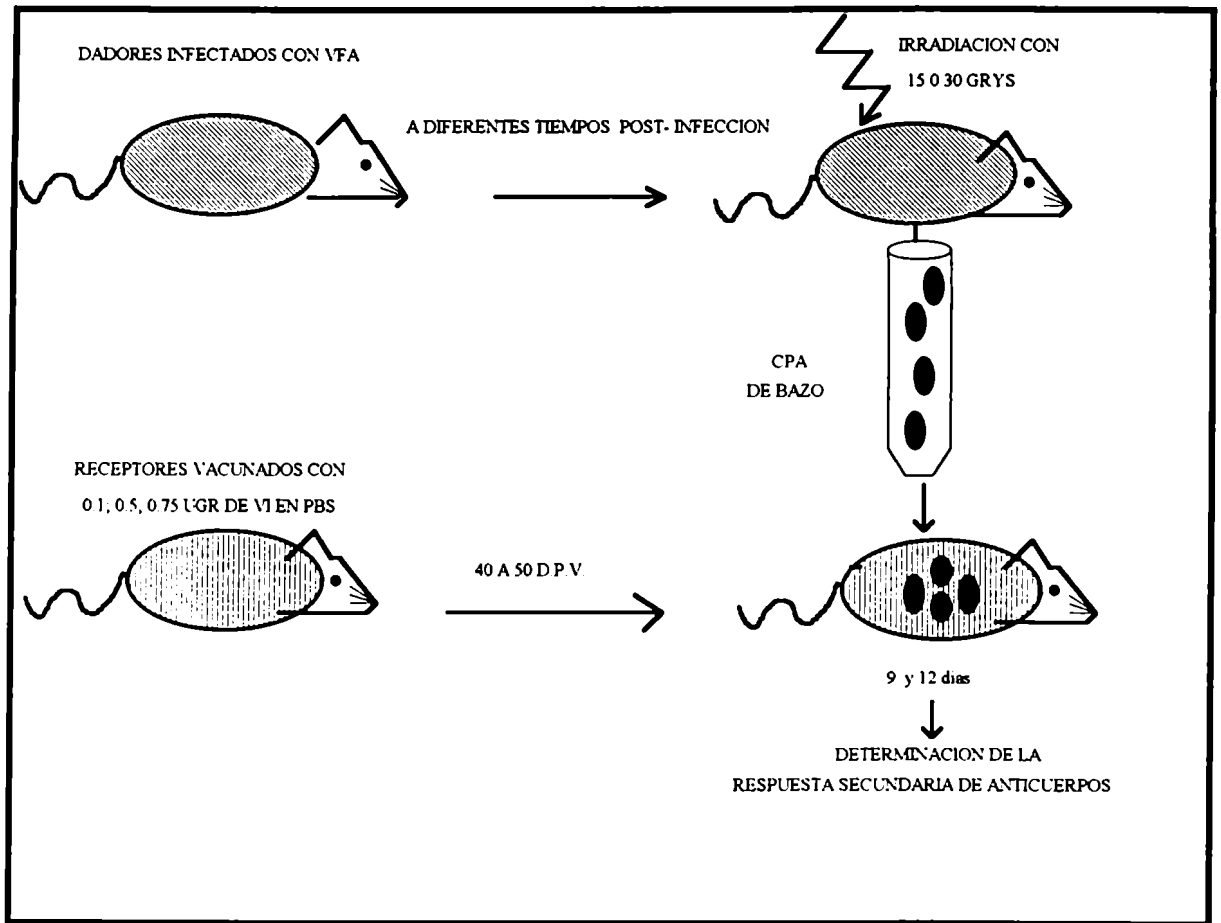
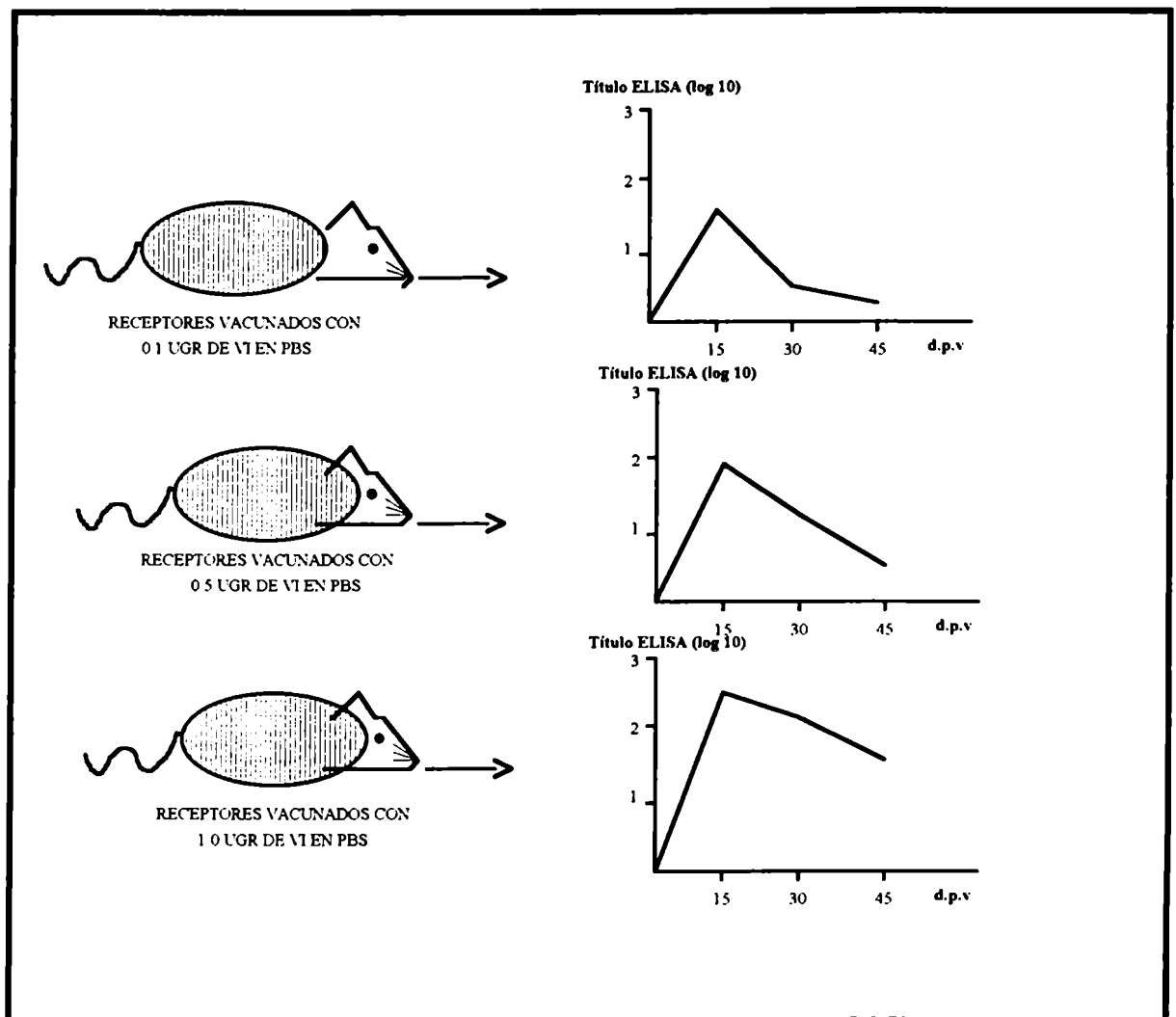


Figura 13

Cinéticas de las respuestas humorales de los receptores (previa al ensayo de PA)



Ratones Balb/c fueron inmunizados con 0,1; 0,5 y 1,0 ugr de VI en PBS. A diferentes d.p.v se obtuvieron muestras de plasma de 4 animales por grupo y se determinó la presencia de Acs totales anti-VFA por ELISA. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones. En ningún caso el DS fue superior a 0,20.

FIGURA 14 **Ensayo de Presentación Antigénica: irradiación o fijación con GA**
in vitro

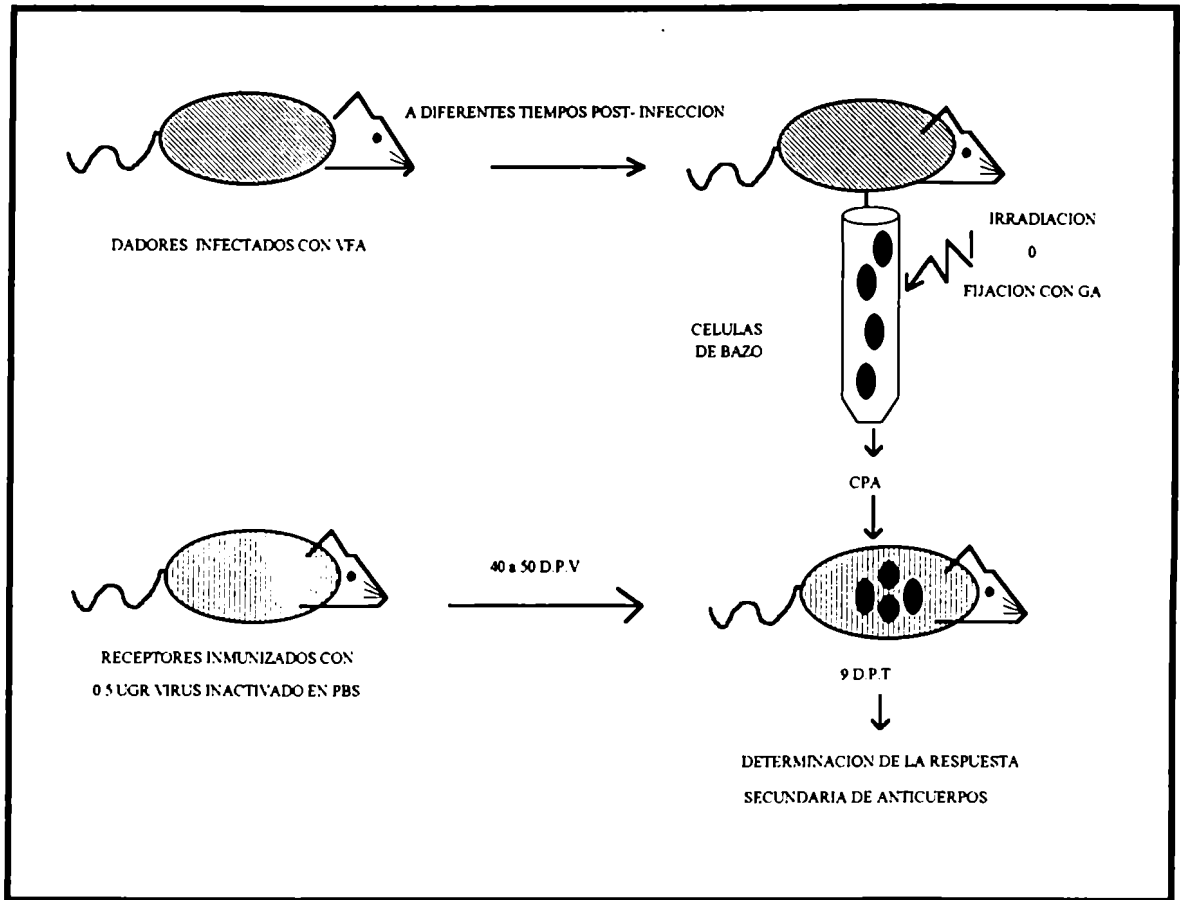


Tabla 4

Establecimiento del sistema de Presentación Antigénica

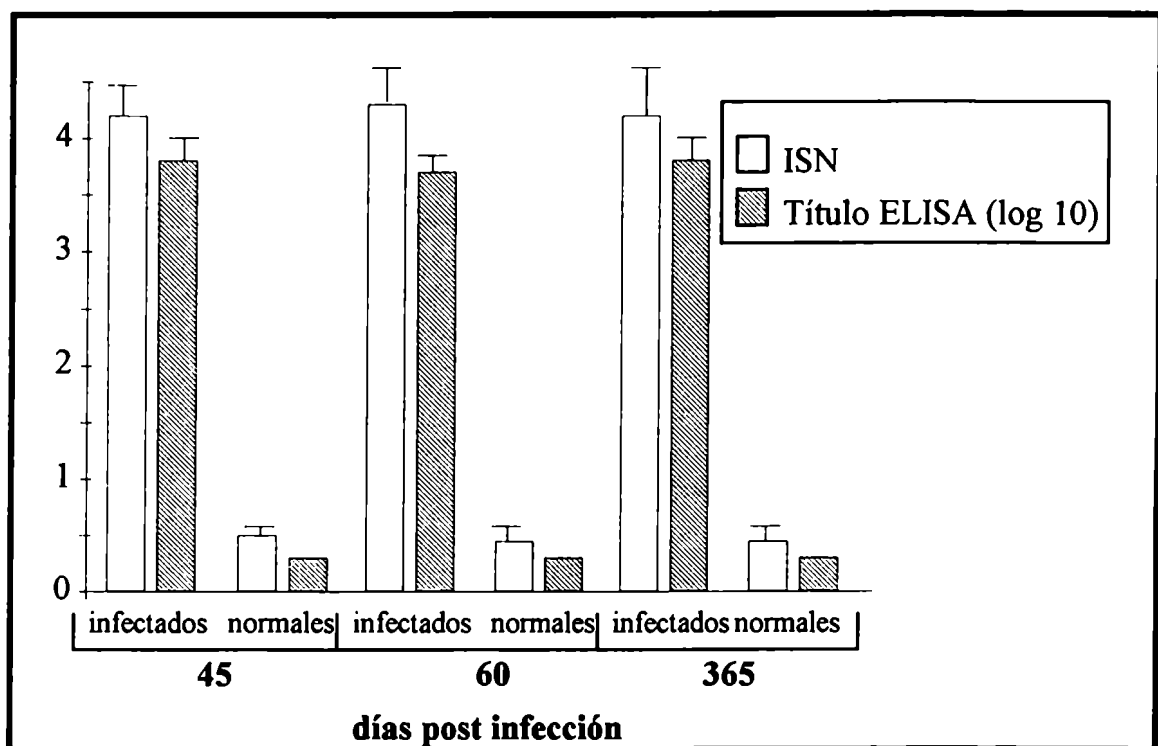
Receptores	Dadores	Virus	Título ELISA	DS
Normal irradiado	-----	(+)	0,3	0,0
Normal irradiado	CPA (15 grys)	(+)	0,3	0,0
Normal irradiado	CPA (30 grys)	(+)	0,3	0,0
Normal irradiado	células nor (30 grys)	(+)	0,3	0,0
Normal	CPA (15 grys)	(-)	0,45	0,1
Normal	células nor (15 grys)	(-)	0,3	0,0
Normal	células nor (30 grys)	(-)	0,3	0,0
Normal	CPA (30 grys)	(-)	0,3	0,0
Normal	CPA (GA)	(-)	0,3	0,0
Vacunado con 0.1 ugr de VI	CPA (15 grys)	(-)	1,4	0,2
Vacunado con 0.1 ugr de VI	células nor (15 grys)	(-)	0,6	0,0
Vacunado con 0.1 ugr de VI	-----	(-)	0,3	0,0
Vacunado con 0.1 ugr de VI	CPA (30 grys)	(-)	0,6	0,0
Vacunado con 0.1 ugr de VI	células nor (30 grys)	(-)	1,2	0,3
Vacunado con 0.1 ugr de VI	CPA (GA)	(-)	1,6	0,4
Vacunado con 0.1 ugr de VI	-----	(+)	1,8	0,4
Vacunado con 0.5 ugr de VI	CPA (15 grys)	(-)	2,2	0,3
Vacunado con 0.5 ugr de VI	células nor (15 grys)	(-)	0,6	0,0
Vacunado con 0.5 ugr de VI	-----	(-)	0,6	0,0
Vacunado con 0.5 ugr de VI	CPA (30 grys)	(-)	1,8	0,0
Vacunado con 0.5 ugr de VI	células nor (30 grys)	(-)	0,6	0,3
Vacunado con 0.5 ugr de VI	CPA (GA)	(-)	1,6	0,2
Vacunado con 0.5 ugr de VI	-----	(+)	2,4	0,3
Vacunado con 1.0 ugr de VI	CPA (15 grys)	(-)	2,1	0,4
Vacunado con 1.0 ugr de VI	células nor (15 grys)	(-)	1,2	0,4
Vacunado con 1.0 ugr de VI	-----	(-)	1,0	0,3
Vacunado con 1.0 ugr de VI	CPA (30 grys)	(-)	1,8	0,3
Vacunado con 1.0 ugr de VI	células nor (30 grys)	(-)	1,3	0,3
Vacunado con 1.0 ugr de VI	CPA (GA)	(-)	1,8	0,3
Vacunado con 1.0 ugr de VI	-----	(+)	3,6	0,0

Células de bazo (150×10^6) provenientes de animales infectados (45 d.p.i.) fueron irradiadas o fijadas con GA (solo pueden actuar como CPA) y transferidas a animales receptores irradiados, normales o presensibilizados. A los 9 días post-transferencia se midió la respuesta de Acs por ELISA. Cada valor corresponde al promedio de 4 mediciones.

Una vez estandarizado el sistema de detección de CPA se evaluó la presencia de éstas en animales infectados a distintos tiempos post infección (45, 60 y 365 d.p.i.).

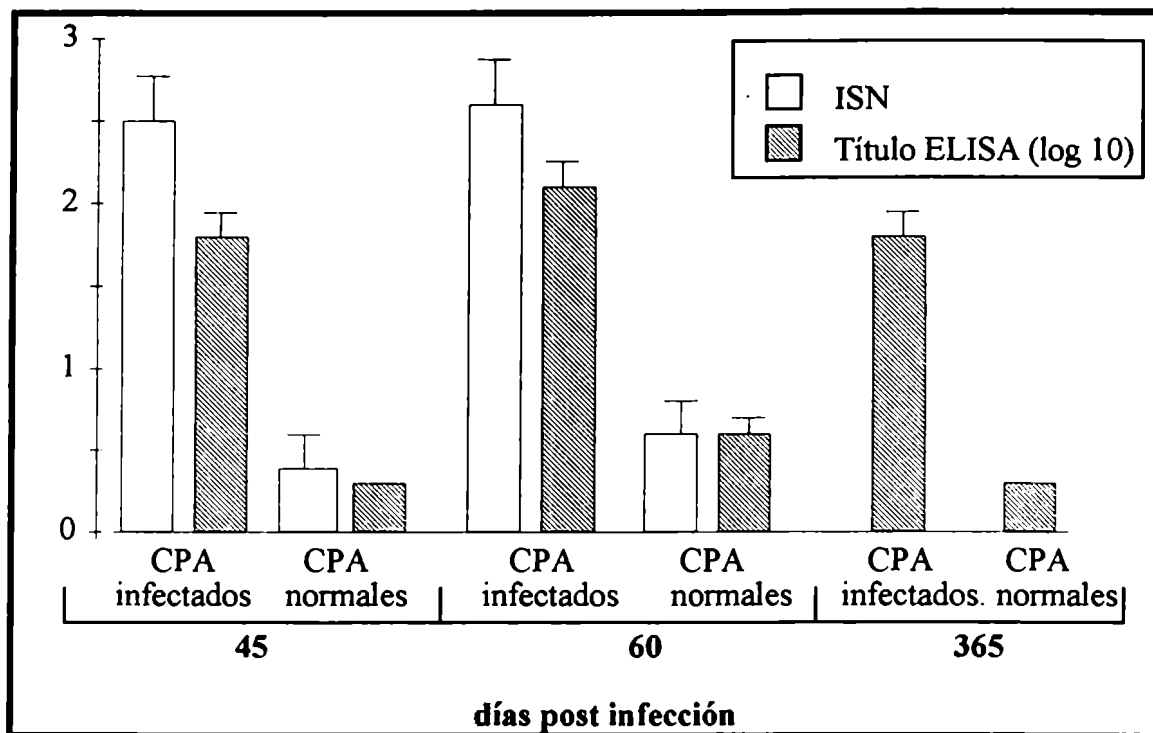
Los esplenocitos irradiados provenientes de animales infectados (CPA) fueron capaces de inducir una respuesta secundaria en los animales receptores independientemente de la antigüedad de la infección (figura 15).

Figura 15 A Títulos de los dadores infectados a distintos tiempos



Ratones Balb/c fueron infectados con 10×10^4 DLRL 50% y a los 45, 60 y 365 d.p.i. se obtuvieron las muestras de plasma de 4 animales por grupo. Cada muestra de plasma se analizó por SN y por ELISA. Cada barra corresponde al promedio de 4 mediciones.

FIGURA 15 B Detección de CPA en animales que fueron infectados a diferentes tiempos

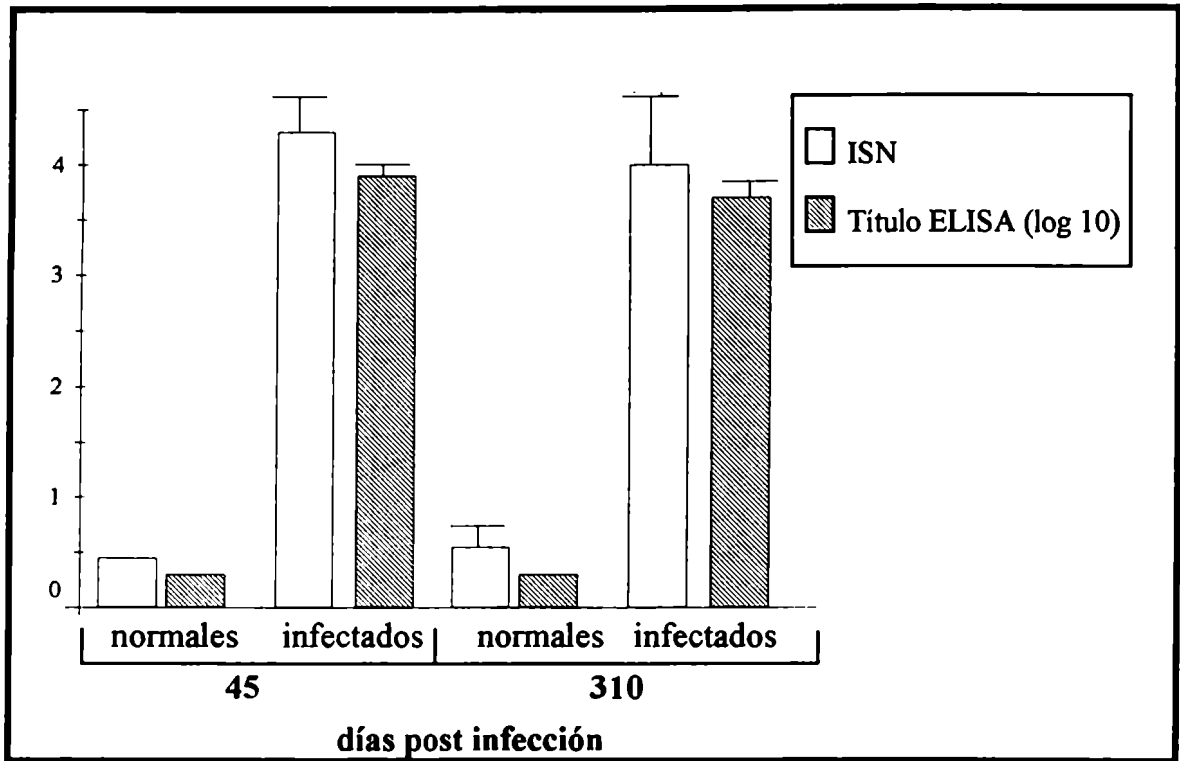


Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA provenientes de animales infectados a distintos tiempos. A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de 3 receptores por grupo y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA. Cada barra corresponde al promedio de 6 mediciones producto de dos ensayos independientes.

IV.7.2 Habilidad de las células B como células presentadoras de antígeno

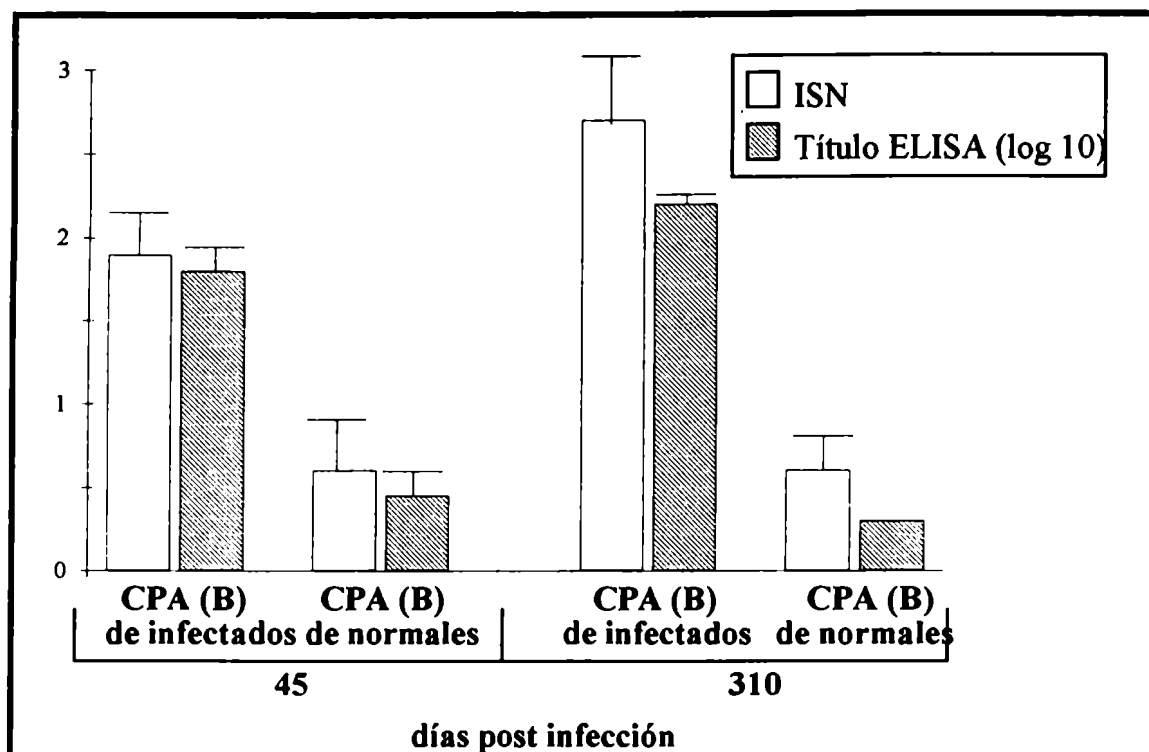
Los resultados descriptos previamente demostraron que las células B de animales infectados eran las responsables de la inducción de Acs en los receptores normales (figura 6A y B). Con el fin de conocer si los linfocitos B de animales infectados eran capaces de presentar antígeno en este sistema, se evaluó el papel de las células B en la presentación del antígeno. Los resultados demostraron que los linfocitos B son capaces de presentar el antígeno eficientemente (figura 16 A y B).

Figura 16 A Títulos de Acs de los animales dadores (infectados a distintos tiempos con el VFA)



Ratones Balb/c fueron infectados con 10×10^4 DLRL 50% y a los 45 y 310 d.p.i. se obtuvieron las muestras de plasma de 3 animales por grupo. Cada muestra de plasma se analizó por SN y por ELISA. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones.

Figura 16 B Detección de células B presentadoras de antígeno (CPA (B)) en animales infectados



Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 90×10^6 CPA (B) (linfocitos B irradiados) provenientes de animales a distintos tiempos p.i.. A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de 4 receptores por grupo y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA. Cada barra corresponde al promedio de 4 mediciones.

IV.7.3 Papel de las células T en los ensayos de PA

Para comprobar la importancia de las células T en los ensayos de PA se transfirieron CPA provenientes de ratones Nu/+ y Nu/Nu (atímicos) a receptores presensibilizados Nu/Nu y Nu/+.

Las CPA provenientes de animales Nu/+ infectados indujeron una importante respuesta secundaria en los animales receptores Nu/+ pero fueron incapaces de inducir una respuesta en los receptores Nu/Nu, demostrando la importancia de la interacción entre las CPA y las células T del animal receptor. Así mismo, las CPA provenientes de animales Nu/Nu infectados fueron eficientes en su capacidad de presentar el antígeno cuando fueron transferidas a receptores Nu/+, comprobando así que las CPA no necesariamente dependen de la presencia de los linfocitos T del dador para su activación (Tabla 5).

Tabla 5 Papel de las células T de los animales receptores en los ensayos de PA

CPA de dadores infectados			Respuesta secundaria en receptores presensibilizados				
Dadores	ISN	DS	Receptores	Elisa	DS	ISN	DS
Nu/+	4,00	0,70	Nu/+	2,40	0,00	3,50	0,00
Nu/+	4,00	0,70	Nu/Nu	0,75	0,21	1,35	0,20
Nu/Nu	3,18	0,45	Nu/+	2,40	0,00	3,50	0,00

Ratones Nu/+ y Nu/Nu presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA provenientes de animales infectados con 10×10^4 DLRL 50% (45 d.p.i.). A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de 3 receptores por grupo y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones. Los controles de irradiación y de transferencia tuvieron títulos de Acs medidos por ELISA $< a 0,45$.

IV.8 Correlación entre el título de Acs anti-VFA y su capacidad de presentar el antígeno en animales dadores inmunizados con virus inactivo

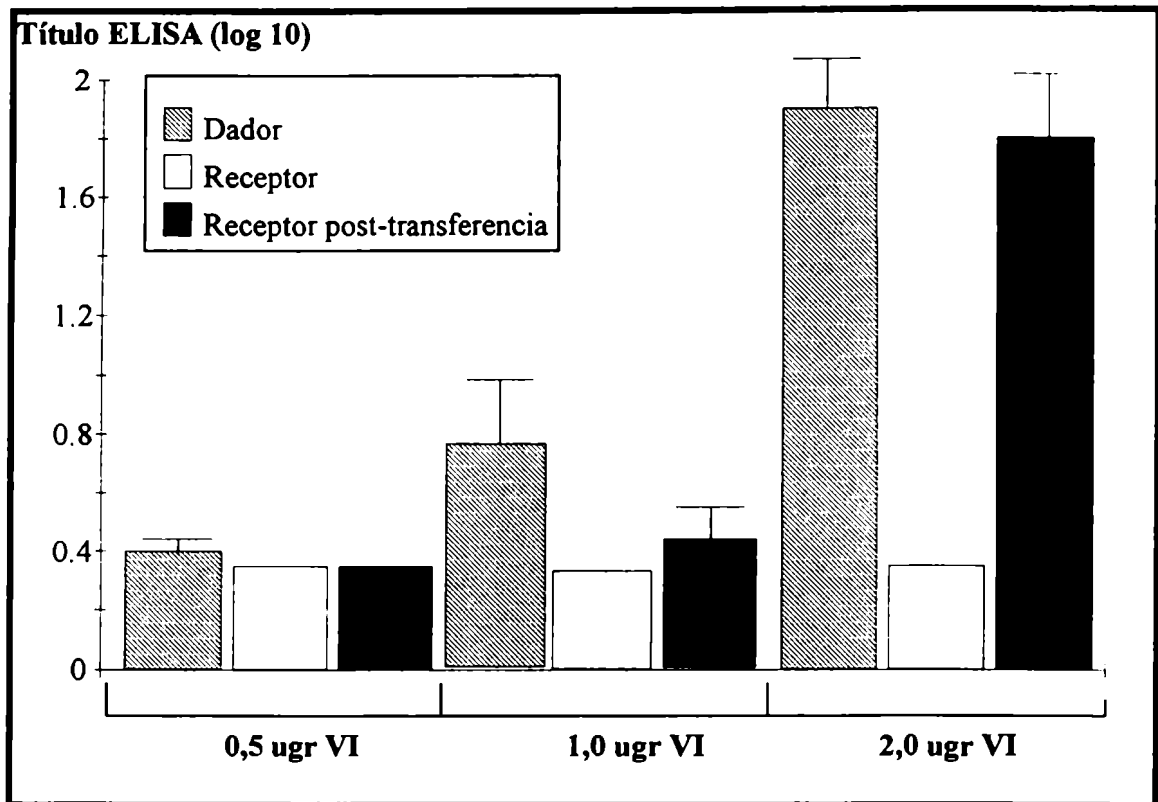
IV.8.1 Evaluación del papel de la masa viral en la Presentación Antigénica

Se inmunizaron animales con vacunas formuladas con diferentes masas antigénicas y se evaluó la inducción de CPA en cada uno de los casos.

Los resultados demostraron que las CPA de los ratones inmunizados con 2 ugr de virus inactivo fueron muy eficientes en los ensayos de PA, mientras que las CPA de los animales inmunizados con dosis menores (1 o 0,5 ugr) resultaron incapaces de inducir una respuesta detectable (figura 17).

Es muy importante destacar que en todos los casos existió una directa correlación entre el título de Acs anti-VFA del dador y la capacidad de sus células de actuar como presentadoras de antígeno.

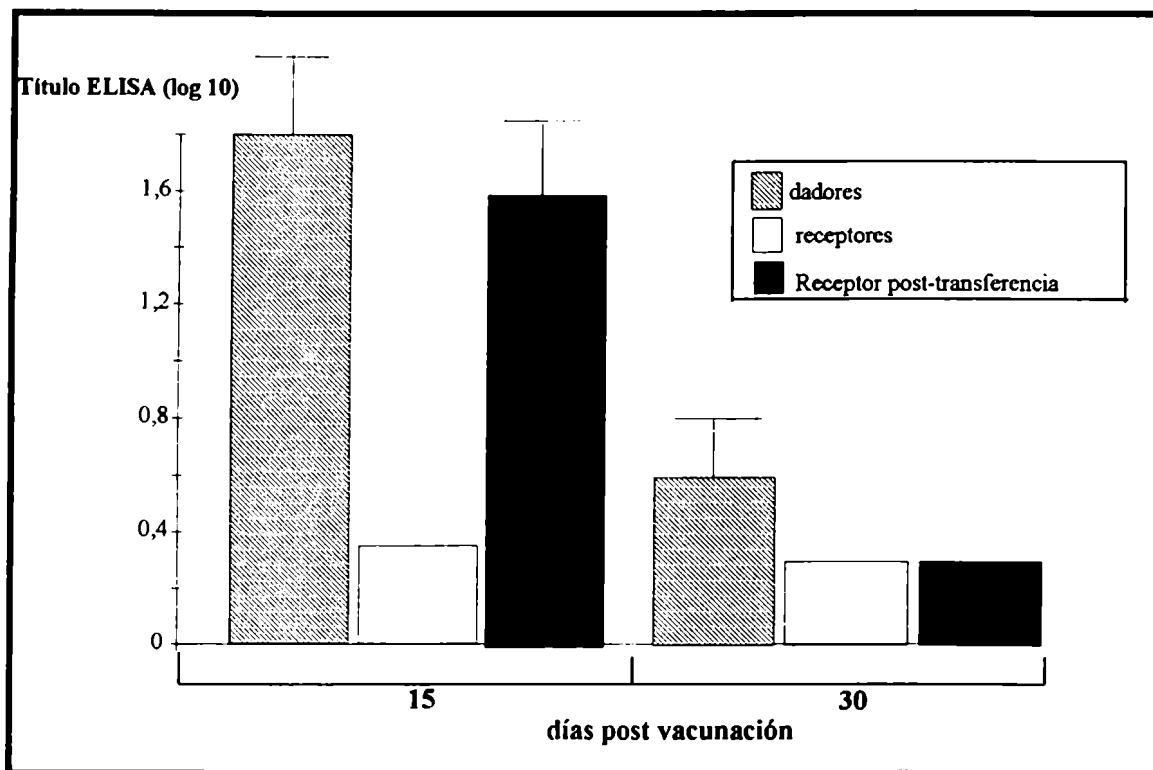
Figura 17 Presencia de CPA en animales vacunados con diferentes dosis de virus inactivo



Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA provenientes de animales inmunizados 30 días antes con 0,5; 1,0 o 2,0 ugr de VI en PBS. A los 9 d.p.t. se obtuvieron las muestras de plasma de 4 animales por grupo y se determinaron los Acs anti-VFA. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones.

IV.8.2 Cinética de la presencia de CPA en dadores inmunizados con virus inactivo

Se evaluó la capacidad presentadora de antígeno en animales inmunizados con 0,5 ugr de VI en PBS a los 15 y 30 d.p.v. Los esplenocitos provenientes de los animales inmunizados 15 días antes de realizarse el ensayo fueron muy eficientes en los ensayos de PA; mientras que los esplenocitos provenientes de animales que fueron inmunizados con 30 días de anterioridad no lograron actuar como CPA. En ambos casos se observó una directa correlación entre la habilidad de los esplenocitos de los animales dadores de actuar como CPA y sus títulos de Acs anti-VFA.

Figura 18**Cinética de la Presentación Antigénica en animales vacunados con 0,5 ugr de virus inactivo**

Ratones Balb/c presensibilizados fueron transferidos i.p. con 150×10^6 CPA provenientes de animales inmunizados con 0,5 ugr de VI en PBS 15 y 30 días antes. A los 9 d.p.t. se obtuvieron las muestras de plasma de 4 animales por grupo y se determinaron los Acs anti-VFA por ELISA. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones.

IV.9 Identificación de las moléculas involucradas en el fenómeno de Presentación Antigénica

IV.9.1 Inhibición *in vitro*

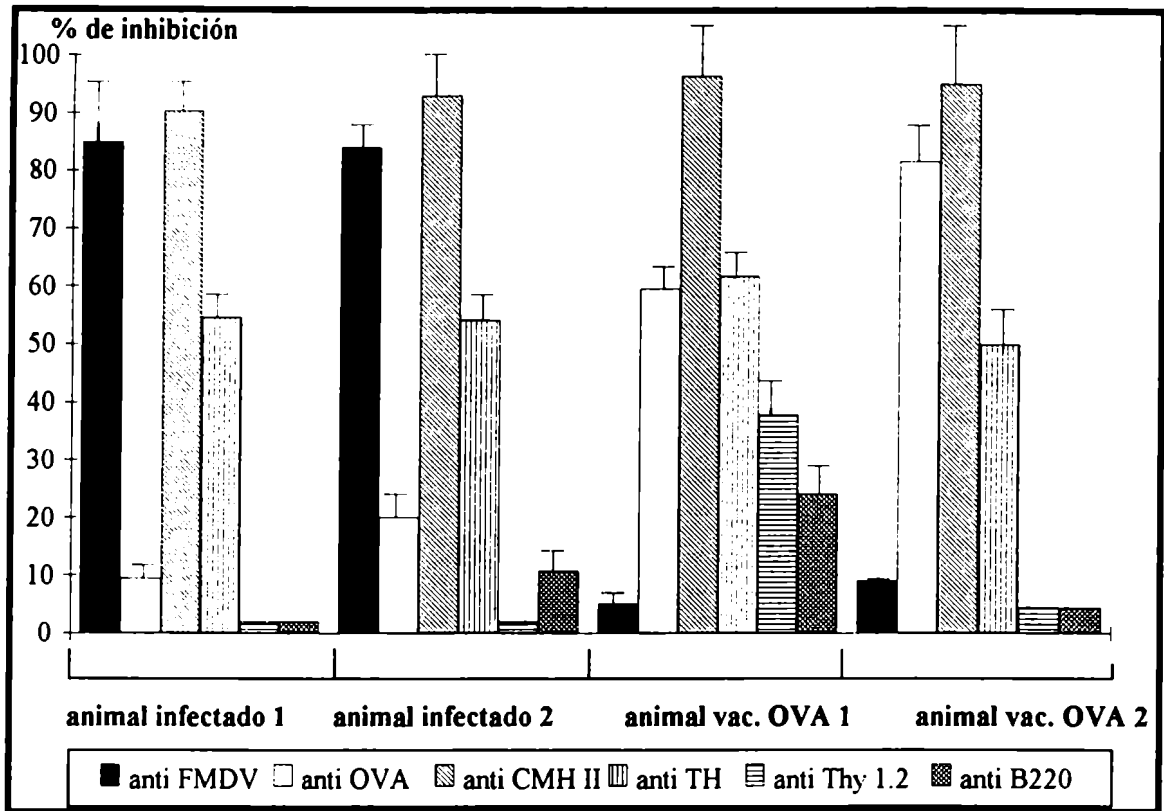
Para comprender el mecanismo que gobierna la inducción de la respuesta inmune en los animales receptores, se analizó la interacción entre los esplenocitos provenientes de los animales dadores y los de los receptores mediante el bloqueo de moléculas inmunorelevantes de la superficie celular.

Los Acs policlonales antígeno específicos, así como los AcM anti-CMH de clase II y contra T colaboradoras fueron muy eficientes en la inhibición de la aparición de la

respuesta inmune, mientras que los Acs contra marcadores de las células B y T fueron incapaces de inhibir este fenómeno (figura 19).

Estos resultados demuestran que la inducción de Acs específicos es estrictamente dependiente del mecanismo de PA.

Figura 19 Inhibición de la Presentación Antigénica con Acs específicos



Se utilizaron esplenocitos provenientes de animales infectados (90 d.p.i) con 10×10^4 DURL 50% o inmunizados con 10 ugr de OVA. Se realizaron cultivos de los esplenocitos en presencia o ausencia de AcM anti-CMH de clase II; L3T4; B220 y Thy 1.2 y Acs policlonales anti-OVA y anti-VFA. Los Acs producidos *in vitro* fueron medidos por ELISA. Los resultados corresponden al % de inhibición inducidos por los Acs bloqueantes definido como:

$\% \text{ inhibición} = [1 - (\text{Abs 490 de los sobrenadantes de linfocitos tratados} / \text{Abs 490 de los sobrenadantes de linfocitos sin tratar})] \times 100.$

I.V.9.2 Inhibición *in vivo*

Para corroborar los resultados obtenidos *in vitro* se realizó un ensayo de inhibición de la PA *in vivo*. Las células provenientes de animales infectados fueron pretratadas con el AcM anti-CMH de clase II antes de ser transferidas a los receptores presensibilizados

Este tratamiento fue capaz de abolir la capacidad de inducir la respuesta secundaria, mientras que el mismo procedimiento realizado con un Ac no relacionado, no alteró la PA.

Tabla 6 Inhibición de la Presentación Antigénica con Acs anti-CMH clase II *in vivo*

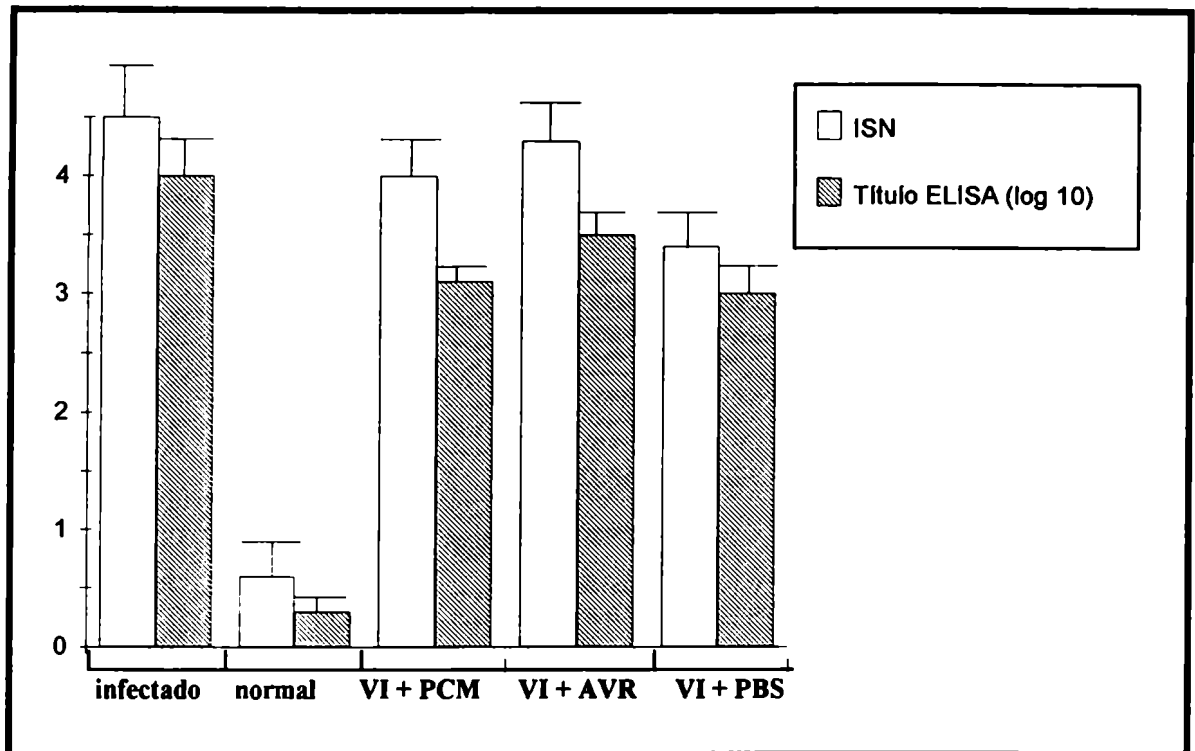
Dadores	receptores	virus	ELISA	DS
infectados e irradiados	irradiados	(+)	0,30	0,00
infectados e irradiados	vacunados y negativizados	(-)	2,40	0,20
infectados + irradiados + anti-CMH clase II	vacunados y negativizados	(-)	0,60	0,10
infectados + irradiados + anti OVA	vacunados y negativizados	(-)	2,30	0,30

Se irradiaron y bloquearon con AcM anti-CMH clase II y con un Ac no relacionado los esplenocitos provenientes de animales infectados (90 días antes con 10×10^4 DLRL 50%). A los 9 d.p.t. se midió por ELISA la presencia de Acs en los animales receptores. Cada valor corresponde al promedio de 4 mediciones.

IV.10 Efecto de AVR y PCM en la Presentación Antigénica

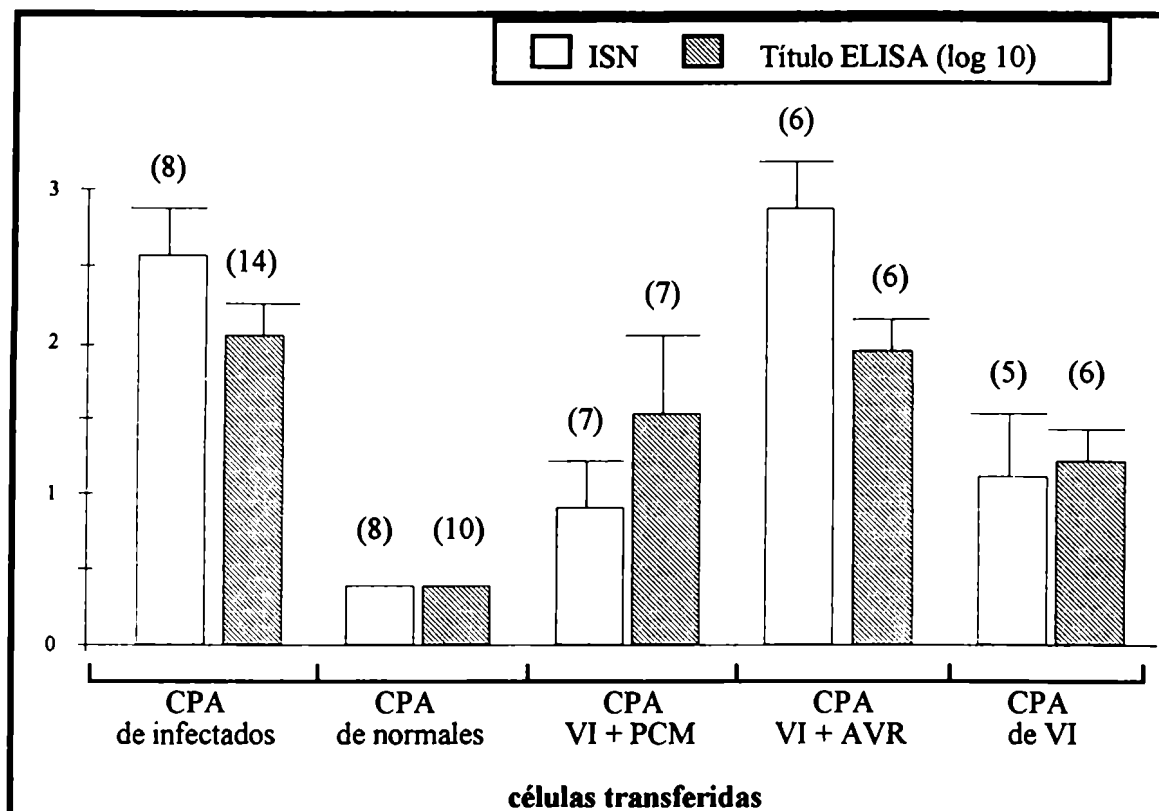
Conociendo la eficiencia de la AVR y del PCM en la inmunomodulación de las vacunas anti-aftosa, resultaba de sumo interés evaluar la influencia de estos inmunomoduladores en la inducción de CPA. Las tres formulaciones (VI + AVR, VI + PCM y VI en el vehículo oleoso) fueron capaces de inducir una fuerte respuesta humoral a los 45 d.p.v (figura 20 A), sorprendentemente, solamente los esplenocitos de animales infectados o inmunizados con VI + AVR presentaron epitopes capaces de inducir AcN (figura 20 B).

Figura 20 A Títulos de Acs inducidos en los animales dadores infectados o inmunizados con vacunas formuladas con diferentes inmunomoduladores a los 45 d.p.v.



Ratones Balb/c fueron inmunizados con virus activo o con vacunas que contenían VI + PCM, AVR o PBS. A los 45 d.p.v. muestras de plasma de 4 animales por grupo fueron tituladas por SN y por ELISA. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones.

Figura 20 B Detección de CPA en animales infectados o inmunizados con vacunas formuladas con diferentes inmunomoduladores



Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA de animales inmunizados 45 días antes con las distintas vacunas. A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de los receptores y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA. Los números entre paréntesis corresponden a la cantidad de animales por grupo provenientes de al menos 2 experimentos independientes.

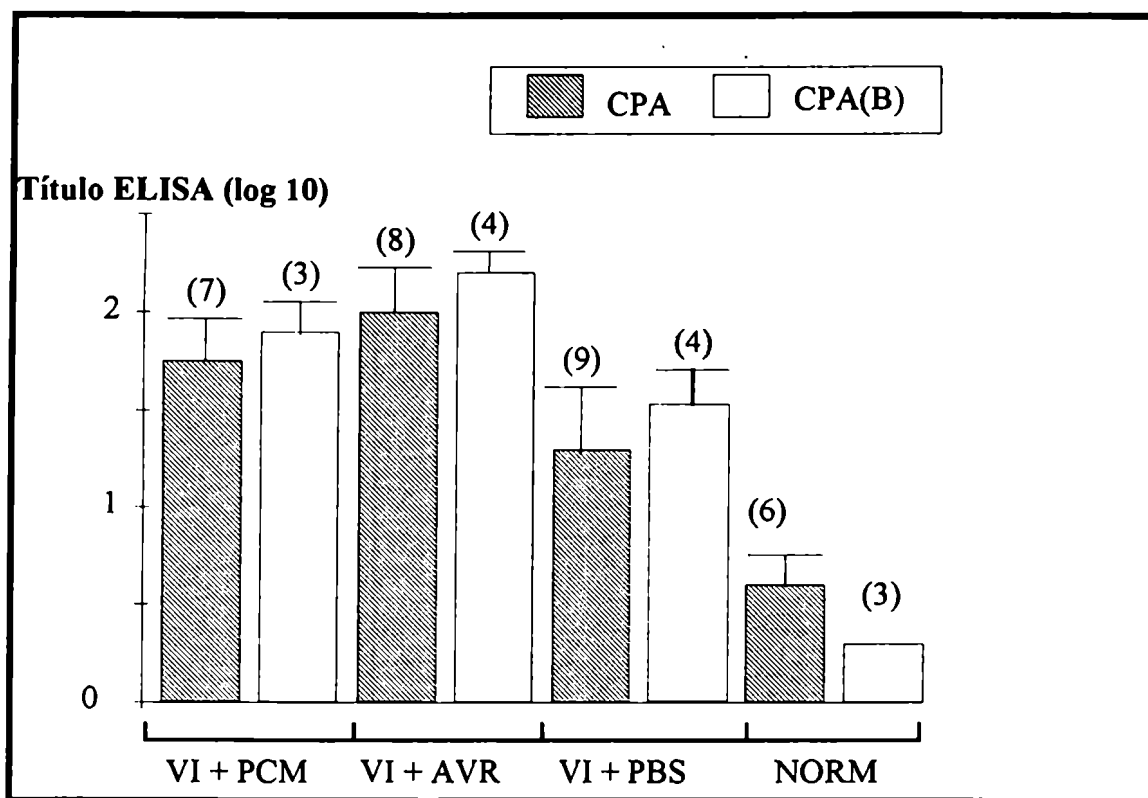
IV.10.1 Habilidad como CPA de las células B provenientes de animales vacunados

Sabiendo que las células B en animales infectados son las responsables de la inducción de Acs en los receptores normales y que las células B irradiadas de animales infectados son capaces de presentar al antígeno, se decidió evaluar la capacidad presentadora de los linfocitos B de animales inmunizados con las vacunas formuladas con los distintos inmunomoduladores.

Las CPA (B) de los animales vacunados fueron capaces de inducir una respuesta de Acs anti-VFA (figura 21).

Figura 21

Detección de células B presentadoras de antígeno (CPA (B)) en animales que fueron inmunizados con vacunas formuladas con distintos inmunomoduladores.



Ratones Balb/c fueron vacunados con VI + AVR, VI + PCM y VI en vehículo oleoso y entre los 45 y 60 d.p.v 150×10^6 CPA o 90×10^6 CPA (B) fueron transferidas a receptores presensibilizados. A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de los receptores y se midieron los Acs anti-VFA. Los números entre paréntesis corresponden a la cantidad de animales por grupo provenientes de al menos 2 experimentos independientes.

VI.10.2 Influencia del antígeno circulante en la Presentación Antigénica en animales inmunizados con vacunas inmunomoduladas

El papel del Ag circulante en la inducción de las CPA se determinó mediante la utilización de un modelo de doble transferencia de células (figura 22). La primera transferencia a receptores normales (previa a la medición de las CPA) permitió desvincularse del Ag circulante del dador. La segunda transferencia (a receptores

presensibilizados) correspondió a la evaluación de la capacidad de presentar el Ag de los receptores de la primera transferencia.

Las tres vacunas produjeron una buena respuesta humoral anti-aftosa cuando fueron inoculadas en los animales que sirvieron de dadores en la prueba (figura 23). Sin embargo, la respuesta humoral inducida en los receptores normales, que recibieron los esplenocitos de dadores infectados o inmunizados con las distintas vacunas antiaftosa, varió según el inmunomodulador utilizado. Así, los receptores normales que recibieron los esplenocitos de animales infectados o vacunados con la vacuna formulada con AVR, fueron capaces de inducir Acs detectables por ELISA y SN mientras que los esplenocitos provenientes de las otras dos formulaciones solo fueron capaces de inducir Acs detectables por ELISA (Tabla 8).

Las características de la respuesta inducida por las CPA presentes en los receptores normales (figura 24) fue semejante a la observada cuando se evaluó la capacidad de CPA en los animales dadores vacunados con las diferentes formulaciones (donde existe antígeno circulante) (figura 18B) demostrando que el antígeno circulante no es el responsable directo del mantenimiento de la presencia de las CPA .

Figura 22

Esquema de transferencia celular para evaluar el papel del antígeno circulante en la PA.

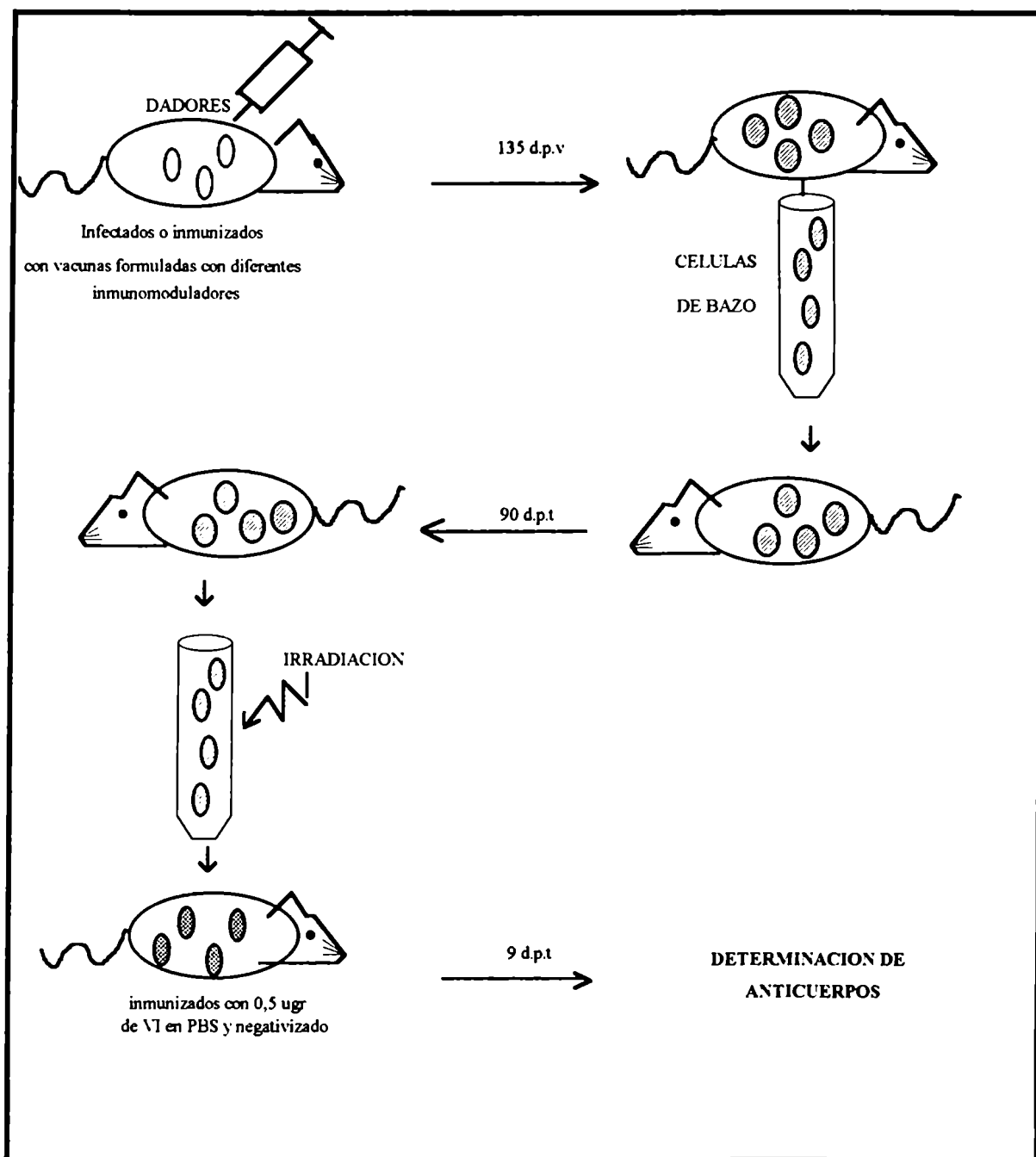
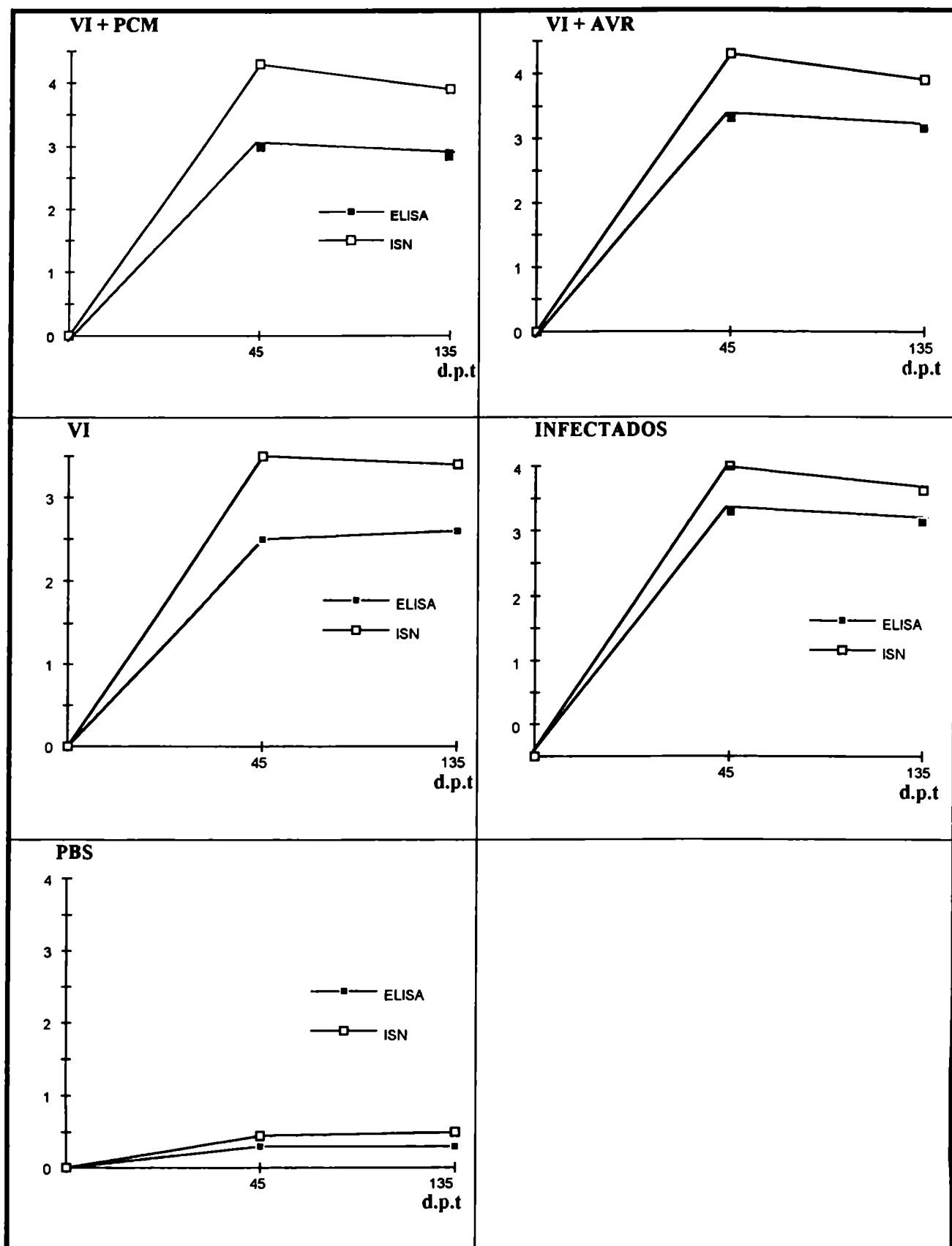


Figura 23

Títulos de los animales dadores inmunizados con las distintas vacunas



Ratones Balb/c fueron inmunizados con vacunas inmunomoduladas con PCM, AVR o sin inmunomodulador. A los 45 y 135 d.p.v muestras de plasma de 4 animales por grupo fueron tituladas por SN y ELISA para Acs anti-VFA. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones. El DS fue siempre inferior a 0,45 para los ensayos de SN, mientras que para los ensayos de ELISA el DS fue siempre inferior a 0,35.

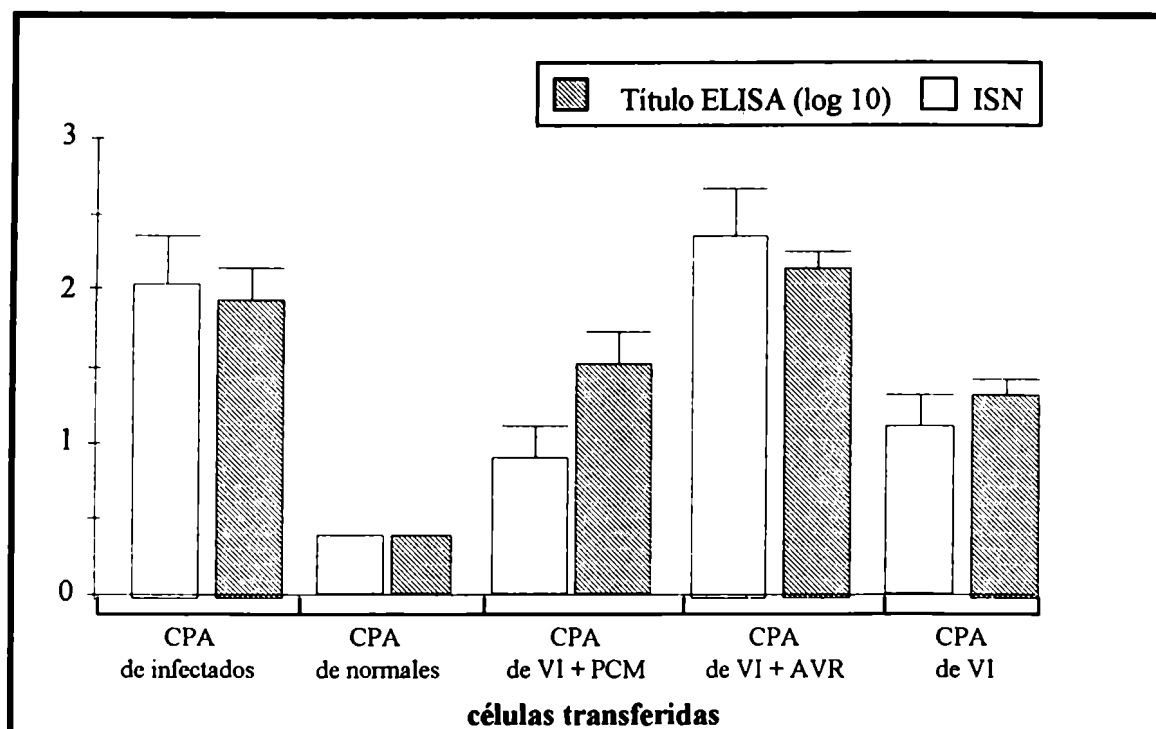
Tabla 7 Acs inducidos en los animales receptores normales

Células de dadores	ISN	DS	ELISA	DS
INFECTADOS	2,31	0,31	2,20	0,00
PBS	0,37	0,03	0,40	0,17
VI + PCM	1,25	0,00	2,80	0,34
VI + AVR	2,12	0,38	2,90	0,34
VI	0,70	0,00	2,15	0,00

Ratones Balb/c fueron inmunizados con diferentes formulaciones de vacunas anti-VFA. A los 135 d.p.i (figura 23) 200×10^6 de esplenocitos provenientes de los animales inmunizados fueron transferidos a animales receptores normales. A los 90 d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo. En la tabla se presenta la media de los AcN y Acs anti-VFA inducidos en los animales receptores.

Figura 24

Detección de CPA provenientes de los animales receptores normales en los cuales no hay antígeno circulante.



Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA provenientes de animales receptores que habían recibido previamente (90 días) esplenocitos de animales infectados o inmunizados con vacunas anti aftosa inmunomoduladas (tabla 7). A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinaron los Acs anti-VFA.

IV.10.3

La secuencia 135-160 de VP1 es presentada eficientemente en animales infectados o inmunizados con distintos inmunomoduladores

La región 130-160 de VP1 del VFA O1 Campos ha sido descrita como altamente inmunogénica en el VFA (Zamorano, et. al., 1995), con el fin de conocer si esta secuencia era presentada por las CPA de animales infectados o vacunados, se analizó la presencia de Acs anti 135-160 inducidos por las CPA en los receptores vacunados y negativizados. Los resultados demostraron que se indujeron Acs que reconocen específicamente a la secuencia 135-160 de VP1 de O1C en los animales receptores (Tabla 8).

Tabla 8

Niveles de Acs anti 135-160 de VP1 inducidos en los ensayos de PA

Dadores inmunizados con:	células transferidas	ELISA anti 135-160	D.S
VI + PCM	esplenocitos totales	1,73	0,28
VI + AVR	esplenocitos totales	2,20	0,34
VI	esplenocitos totales	1,70	0,17
VA	esplenocitos totales	2,10	0,30
Cel. B VI + PCM	Linfocitos B	2,20	0,17
Cel. B VI + AVR	Linfocitos B	2,20	0,17
Cel. B de infectados.	Linfocitos B	2,00	0,17
0,5 ugr VFA	-----	0,40	0,17

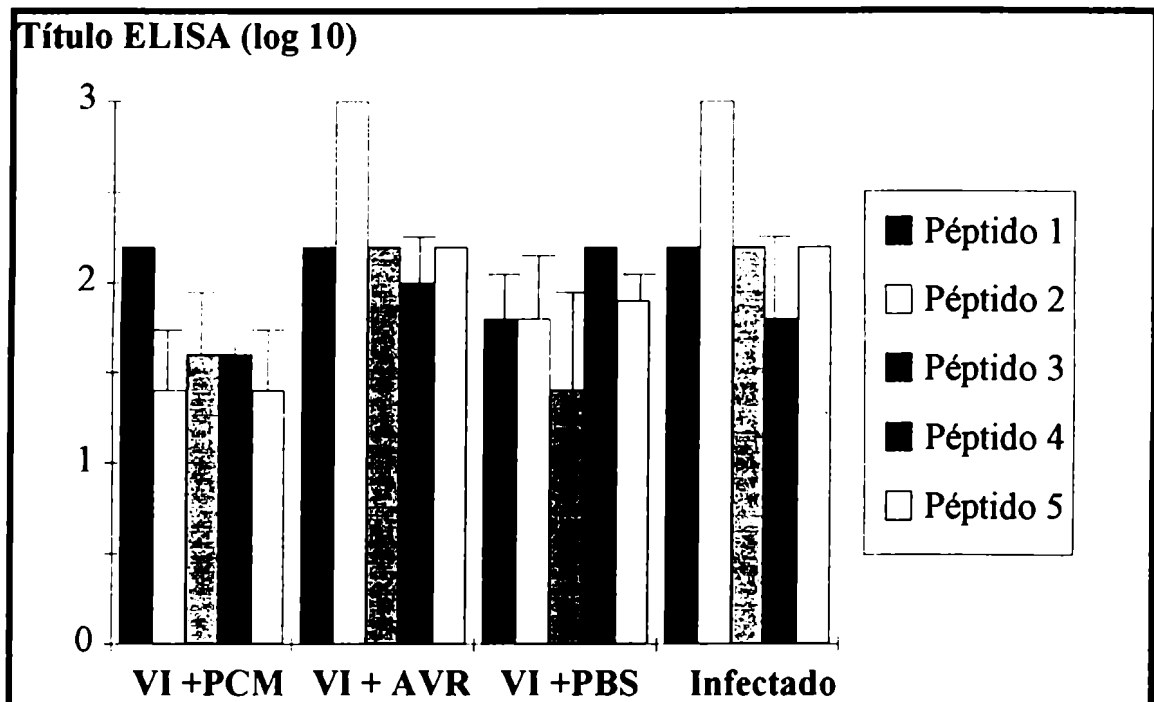
Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA de animales vacunados 45 días antes con los distintos inmunomoduladores. A los 9 d.p.t se obtuvieron las muestras de plasma de los receptores y se determinaron los totales anti-135-160 de VP1 de O1C.

Debido al detallado conocimiento de la estructura epitópica del P1 se utilizó este péptido para analizar el efecto de los dos inmunomoduladores sobre un posible fenómeno de procesamiento diferencial de las distintas porciones de la secuencia 135-160.

Los resultados demostraron que, según el inmunomodulador utilizado, se indujeron Acs que reconocen diferencialmente distintas porciones de la secuencia 135-160 de VP1 de O1C en los animales receptores (figura 25).

Figura 25

Niveles de Acs dirigidos contra diferentes segmentos del péptido 135-160 de VP1 inducidos en los ensayos de PA.



Ratones Balb/c presensibilizados recibieron i.p. 150×10^6 CPA de animales vacunados 45 días antes con VI en presencia de los distintos inmunomoduladores. A los 9 d.p.t se determinó su reactividad contra los péptidos P1, P2, P3, P4 y P5 mediante la técnica de ELISA.

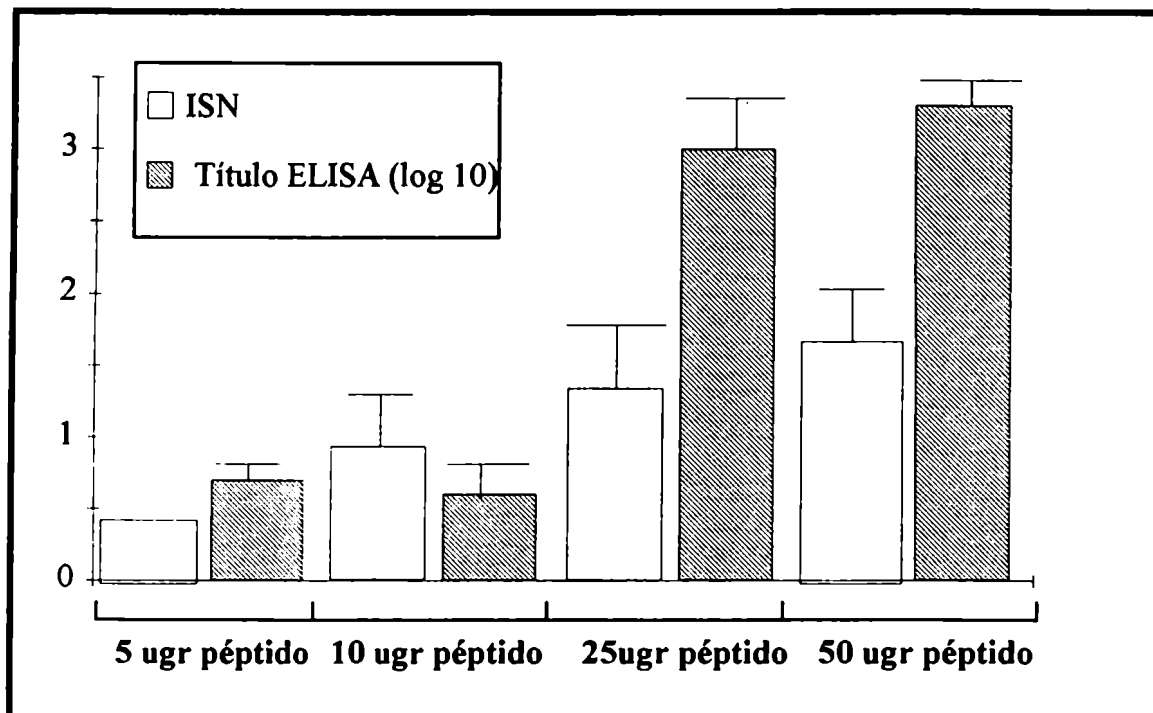
IV.11 Evaluación de la capacidad inmunogénica del péptido 135-160

IV.11.1 Transferencia de esplenocitos de animales inmunizados con el péptido 135-160 a receptores normales

Con el fin de conocer si los esplenocitos de los animales vacunados con la secuencia 135-160 de VP1 eran capaces de inducir una respuesta en los receptores normales, 200×10^6 células de bazo de animales inmunizados 90 días antes con 5, 10, 25 o 50 μ g del péptido correspondiente a la secuencia 135-160 de VP1 fueron transferidos a receptores normales.

A pesar que con las mayores dosis (25 y 50 μ g) fue posible detectar Acs anti-VFA por ELISA (figura 26) solo se logro inducir AcN en aquellos receptores que recibieron esplenocitos provenientes de dadores hiperinmunizados (3 dosis de 50 μ g) (figura 27).

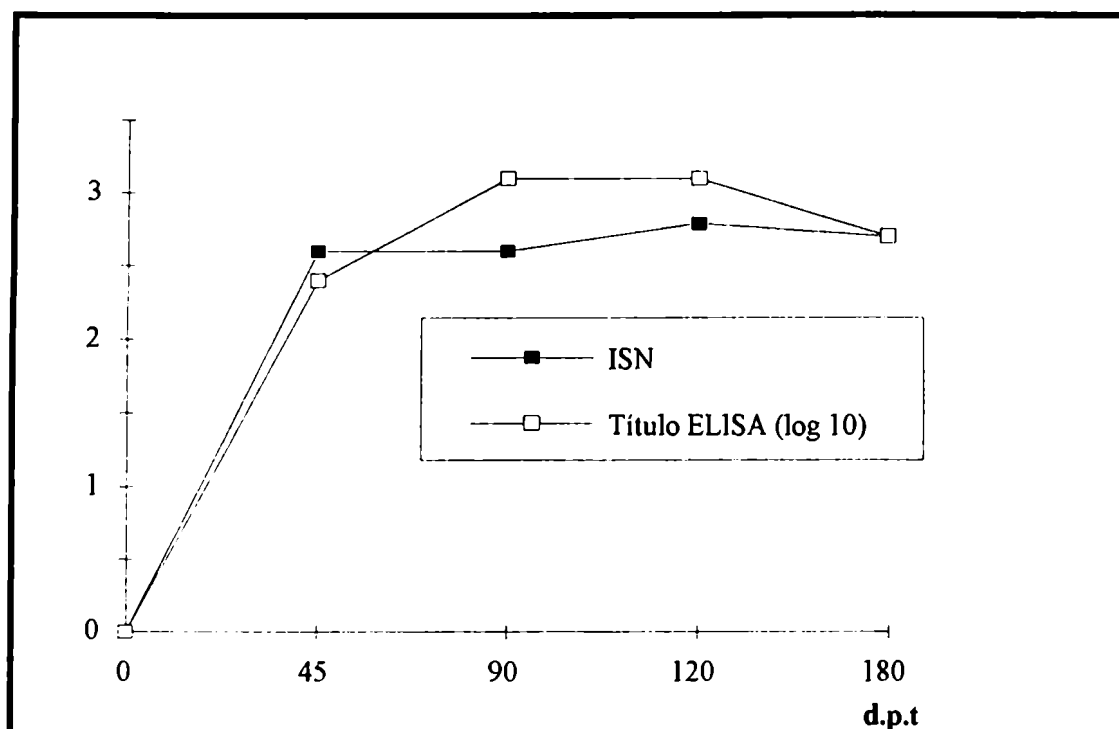
Figura 26 Transferencia de esplenocitos de animales vacunados con distintas concentraciones del péptido (I35-160 de VPI) a receptores normales



Ratones Balb/c vírgenes recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos de animales vacunados con distintas concentraciones del péptido correspondiente a la secuencia 135-160 de VP1. A los 30 d.p.t se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA.

Figura 27

Transferencia de esplenocitos de animales hiperinmunizados con 3 dosis de 50 ugr del péptido (135-160 de VP1) a receptores normales



Ratones Balb/c vírgenes recibieron i.p. 200×10^6 esplenocitos de animales inmunizados 3 veces con 50 ugr del péptido correspondiente a la secuencia 135-160 de VP1. A distintos tiempos post-transferencia se obtuvieron muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinó el ISN y los Acs anti-VFA por ELISA

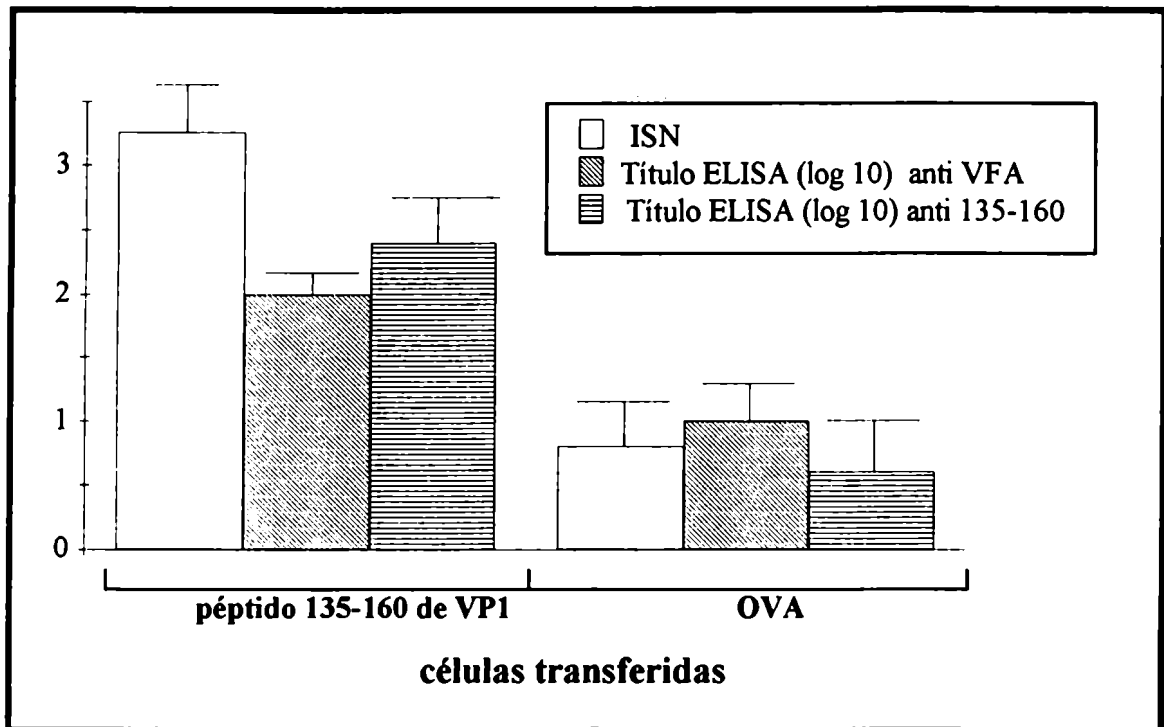
IV.11.2 Determinación de CPA en animales inmunizados con el péptido 135-160

Conociendo que los esplenocitos de los animales inmunizados con 135-160 eran capaces de inducir una respuesta en los receptores normales se propuso evaluar la capacidad de los esplenocitos de estos animales de actuar como CPA.

Los esplenocitos de animales inmunizados con al secuencia 135-160 de VP1 fueron muy eficientes en la inducción de Acs anti-VFA en los receptores presensibilizados mientras que los esplenocitos de los animales vacunados con una proteína no relacionada (OVA), utilizada como control fallaron en la inducción(figura 28).

Figura 28

Detección de CPA específicas en animales inmunizados con el péptido 135-160



Ratones Balb/c presensibilizados con VFA recibieron i.p. 150×10^6 CPA de animales inmunizados con 3 dosis de 50 ugr del péptido correspondiente a la secuencia 135-160 de VP1 o con 3 dosis de 50 ugr de OVA en AIF. A los 9 d.p.t. se obtuvieron las muestras de plasma de 3 animales por grupo y se determinó el ISN y los Acs totales anti-VFA.



DISCUSIÓN

VI DISCUSION

La FA es un serio problema sanitario que afecta a las especies biunguladas provocando severas consecuencias económicas (Cottral et al., 1975). La vacunación es el principal medio de control de la enfermedad, sin embargo, las vacunas formuladas con virus inactivo inducen respuestas de AcN de corta duración (Morgan et al., 1988; Doel, 1985; Brown, 1980) siendo necesario la revacunación periódica. Por el contrario los animales que sufren una infección desarrollan un estado inmunitario de larga duración caracterizado por altos niveles de AcN que resultan protectores contra la reinfección con el serotipo homólogo (Beristein, et. al., 1993; Piatti et. al., 1991; Lopez, et. al., 1990; Cunliffe, 1964). Aunque este fenómeno es conocido desde hace tiempo, las bases inmunológicas responsables de la prolongada inmunidad inducida luego de la infección se encuentran aún sin dilucidar.

Con la intención de comprender la causa de la respuesta inmune humoral al VFA, la primera parte de este trabajo de tesis estuvo dirigida a aclarar si el mantenimiento de los niveles de AcN puede ser explicado por un fenómeno de infección persistente del individuo convalesciente (presentando un modelo de "tipo portador"), o mediante un fenómeno de persistencia antigénica, sin la presencia de partículas infecciosas (persistencia del antígeno mediada por células presentadoras de antígeno-CPA). La segunda parte del trabajo de tesis fue dirigida a estudiar los mecanismos de acción de dos efectivos inmunomoduladores (Avridine -AVR- y la pared de Mycobacterium -PCM) ambos inductores de una prolongada respuesta humoral cuando son administradas en vacunas con virus inactivado.

El fenómeno de la infección persistente en bovinos que sufren una infección con virus aftoso se produce en un bajo porcentaje de individuos los cuales quedan crónicamente infectados (portadores) (Suthmoller et. al., 1966; Gebauer et. al., 1984; Sadir et. al., 1988). Sin embargo, no ha sido posible hallar diferencias significativas en cuanto al estado inmunitario inducido por la infección entre bovinos que eliminaron completamente la infección y aquellos que quedaron en estado de "portador" (Sadir et. al. 1988).

En relación a la existencia del fenómeno de persistencia antigénica durante prolongados períodos de tiempo, especialmente en el caso de antígenos inertes, la constante presencia de determinantes antigénicos sobre CPA ha sido previamente reportada (Klaus et. al., 1986).

De hecho, varios autores han propuesto que la presencia de una respuesta inmune continua o de larga duración debe, indefectiblemente, estar ligada a la presencia de antígeno dentro del sistema (Gray et. al. 1988, Felbush 1973, Asconas et. al. 1972). Sin

embargo, esta posición se encuentra aún bajo controversia ya que ensayos de transferencia adoptiva de células inmunocompetentes han demostrando que las células B, específicas para el antígeno en cuestión, pueden persistir en el nuevo huésped por más de 7 meses sin necesidad de reestimulación antigénica (Sprent et. al. 1991, Schitteck et. al. 1990, Udhayakumar et. al. 1988).

La infección experimental en ratón adulto genera una continua e intensa respuesta de AcN tal como sucede en el huésped natural (Sadir et. al., 1988). Esta prolongada síntesis de Acs anti-VFA hace del modelo murino un excelente sistema para el estudio de los mecanismos involucrados en una prolongada respuesta humoral. Adicionalmente, este modelo presenta un interesante paralelismo con la respuesta inmune inducida en el hospedador natural (Zamorano, et. al. 1995, Berinstein et. al., 1993, Piatti et. al. 1991, Lopez et. al. 1990, Borca et. al. 1986, Fernandez et. al. 1986). Estas características le confieren al modelo la virtud de ser un posible medio para estudiar y predecir la respuesta que se desarrollará en los huéspedes naturalmente susceptibles. A esto habría que añadir que los plazos para la obtención de resultados son sensiblemente más cortos que con otras especies y que existe un amplísimo conocimiento acerca del sistema inmune de estos animales por lo que se facilita la diagramación experimental a diferencia de lo que sucede en el huésped natural

La observación experimental de que es posible la transferencia de la prolongada respuesta de AcN de un dador convaleciente a un receptor normal, sin la necesidad de un reestimulación antigénica del receptor (figura 4 y 5), abrió la posibilidad de utilizar este modelo para el estudio de las bases celulares involucradas en el establecimiento de una prolongada respuesta inmune humoral

Una más detallada caracterización del fenómeno fue realizada mediante una serie de experimentos desarrollados *in vivo* donde se utilizaron receptores normales o inmunosuprimidos mediante irradiación. Estos experimentos permitieron definir que los linfocitos B, a diferencia de los linfocitos T, son suficientes para la inducción del fenómeno independientemente del sistema inmune del animal receptor, y que existe una correlación entre la respuesta humoral inducida en los ratones receptores y los títulos de Acs de los animales dadores (8 B y 6 A).

El primer factor que fue considerado como causal de la prolongada respuesta inmune inducida por la infección fue la posible presencia de una infección persistente en los ratones infectados experimentalmente. Con respecto a este punto es importante enfatizar que los ensayos de transferencia utilizados en este trabajo permitieron acotar el sistema a

los esplenocitos transferidos, debido a que estas células resultaron suficientes para inducir una prolongada respuesta humoral en los animales receptores normales (Tabla 1).

A su vez, la hipótesis de la existencia de una infección persistente fue también descartada mediante la utilización de varios métodos, en especial la falta de detección del genoma utilizando un ensayo de PCR cuya sensibilidad es de 10^{-3} DLRL 50%. (Tabla 3 A y B). Además, el que haya sido posible obtener resultados similares a través de la inmunización de los animales dadores con antígenos inertes corroboró que la replicación viral definitivamente no es una condición indispensable para que se induzca una prolongada respuesta humoral (figura 6B).

La presencia de niveles significativos de Acs recién detectados a partir de los 15 d.p.t. en los receptores normales (que recibieron esplenocitos provenientes de dadores infectados), más la prolongada duración de la respuesta humoral inducida post-transferencia (figura 5) así como la inhibición de la producción de Acs como resultado de la irradiación de las células dadoras (figura 9), sugieren que las células plasmáticas transferidas no participan en la producción de Acs en los animales receptores.

Habiéndose descartado que la prolongada respuesta humoral inducida por los esplenocitos de dadores infectados en los receptores normales se debía a una infección persistente o a la transferencia de células plasmáticas, se decidió estudiar el papel de la presencia del antígeno procesado en la superficie de las CPA en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune.

El estudio de la presentación antigénica (PA) como mecanismo implicado en el establecimiento de una prolongada respuesta humoral fue desarrollado utilizando un modelo *in vivo*, capaz de detectar la presencia de CPA (figura 14).

Básicamente, se intentaron dos estrategias para la detección de estas células: (i) Inducir una respuesta humoral primaria mediante la transferencia de CPA (provenientes de animales infectados) a animales receptores normales. (ii) Inducir una respuesta humoral secundaria a partir de la transferencia de CPA a animales receptores presensibilizados (vacunados y negativizados) al antígeno.

Para evitar que las células de los animales donantes reaccionen produciendo Acs anti-VFA (que se confunda con la respuesta inducida en los animales receptores), los esplenocitos de animales dadores fueron inmunosuprimidos mediante fijación con glutaraldehído (GA) o por irradiación.

El rendimiento de CPA obtenido a partir de los animales irradiados fue muy bajo debido a que los linfocitos resultaron ser muy lábiles durante el proceso de manipulación. Es por ello que para disminuir el número de animales dadores (aumentar el número de CPA obtenidas por animal dador), se decidió proceder a irradiar los esplenocitos *in vitro*, lo que logró disminuir el número de animales dadores entre la mitad y la tercera parte.

Las CPA obtenidas a partir de cualquiera de las dos metodologías (fijación con GA o irradiación de los linfocitos) fueron incapaces de inducir una respuesta primaria en receptores normales. La falta de respuesta parece que es debida a un problema de sensibilidad del sistema y no a la ausencia de CPA ya que cuando las mismas CPA fueron transferidas a animales presensibilizados se obtuvo una consistente respuesta secundaria (tabla 4).

Adicionalmente, se observó que las CPA obtenidas mediante el tratamiento con GA resultaron ser menos eficientes en su capacidad de presentar el antígeno que las CPA obtenidas por irradiación (tabla 4). Es posible que la diferencia entre ambas técnicas pueda deberse a una disminución cuali o cuantitativa en los epitopes presentados por las CPA obtenidas por fijación con GA debido a los pequeños acúmulos de células que se forman cuando las células son fijadas, o a pequeñas alteraciones que el tratamiento con GA pueda producir en la membrana celular del esplenocito.

En resumen, la metodología desarrollada permitió la detección funcional de CPA específicas para el virus aftoso en animales que habían sido experimentalmente infectados.

Dos datos experimentales merecen ser destacados. (i) Las células B son suficientes para la producción del fenómeno (figura 16B). (ii) Las CPA fueron capaces de permanecer en el animal dador por lo menos 365 días después de la infección (figura 15 B).

El hecho que CPA provenientes de ratones infectados Nu/+ hayan sido incapaces de inducir una respuesta en receptores presensibilizados Nu/Nu (carecen de células T) demostró que para la inducción de la respuesta es crítica la interacción entre las CPA y las células T. Además, la presencia de CPA específicas en los ratones Nu/Nu infectados permitió demostrar que las células T no son necesarias para la inducción de las CPA. (tabla 5)

La comprobación de que el fenómeno descrito es definitivamente dependiente de los clásicos mecanismos de presentación antigénica fue realizada mediante ensayos *in vitro* de inhibición de la producción de Acs. Para ello, sueros específicos contra la partícula viral, o AcM contra antígenos linfocitarios de membrana fueron utilizados como bloqueantes de la inducción de anticuerpos específicos. Mediante esta metodología fue posible demostrar que el CMH de clase II, el antígeno L3T4 (específico de los linfocitos T colaboradores), así como los epitopes virales eran críticos en la inducción de la respuesta. Sin embargo, AcM contra antígenos específicos para linfocitos T (Thy 1.2) o B (B220) resultaron irrelevantes en la inhibición de este fenómeno demostrando la especificidad de las moléculas involucradas en la inducción de la respuesta humoral (figura 19).

Corroborando estos resultados *in vitro*, ensayos de bloqueo realizados *in vivo*, utilizando el AcM anti clase II, también inhibieron el fenómeno de PA (tabla 6).

La utilización de vacunas formuladas con virus inactivo permitió obtener animales que poseían distintos títulos de Acs ya sea por haber sido inmunizados con diferentes masas antigénicas o por el tiempo post inmunización en el cual se encontraban. La utilización de estos animales como dadores en los ensayos de PA permitió establecer la presencia de una correlación entre la actividad de las CPA en los animales dadores y los niveles de Acs circulantes (figuras 17 y 18).

La inhibición de la PA *in vitro*, los ensayos de inhibición de la PA *in vivo* y el establecimiento de una correlación entre la capacidad de presentar el Ag y el título de Acs del animal dador (figura 17 y 18) indican que, en el modelo utilizado, la presencia de CPA es el mecanismo que media la prolongada respuesta humoral anti-VFA que se observa en animales que fueron infectados.

Adicionalmente, los experimentos de doble transferencia (esplenocitos de animales receptores de células provenientes de un dador infectado fueron re-transferidos a un nuevo grupo de receptores normales) demostraron que el fenómeno es inducido por un número limitado de CPA específicas para el VFA, ya que sólo fue posible detectar CPA en el primer grupo de receptores normales (figura 24), no así en el segundo, en el que, se estima, el número de CPA recibidas posiblemente no fue suficiente para la inducción de la respuesta (datos no presentados).

Una buena vacuna anti-VFA debe ser capaz de generar una fuerte respuesta humoral y de mantener la población de linfocitos específicos de memoria para que sea posible producir una rápida respuesta protectora en el momento de la invasión del virus. En la protección contra agentes virales los niveles de Acs circulantes, así como la clase apropiada de estos, poseen una importancia crítica.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se había observado una repuesta humoral aumentada en los animales vacunados con formulaciones oleosas inmunomoduladas con AVR o PCM en relación a aquellos inmunizados con la emulsión oleosa convencional (Berinstein et al., 1993). Dado que el nivel y duración de la respuesta inmune al VFA está ligado a la presencia de CPA en esta parte del trabajo de tesis se focalizó en el estudio del fenómeno de presentación antigénica como el posible mecanismo de acción de estos inmunoestimulantes.

La estrategia utilizada para el estudio de los mecanismos de acción de estos adyuvantes fue semejante a la empleada para comprender los mecanismos involucrados en la prolonga respuesta humoral inducida por la infección. Brevemente, (i) se caracterizó la o las poblaciones celulares involucradas en la respuesta, (ii) se evaluó la

capacidad de las distintas vacunas en inducir células de memoria, (iii) se estudió la capacidad de las distintas formulaciones en inducir eficientemente CPA, y (iv) se determinó si la presencia de antígeno circulante era importante en el mantenimiento de la respuesta.

Es muy importante destacar que las 3 vacunas utilizadas fueron capaces de inducir altos niveles de AcN cuando fueron aplicadas en los animales que actuarían como futuros dadores (figura 23). La transferencia de esplenocitos de animales inmunizados con la vacuna inmunomodulada con AVR fue capaz de inducir AcN en los ratones receptores normales al igual que ocurriera con los esplenocitos provenientes de los animales infectados; mientras que, sorpresivamente, los receptores de esplenocitos de animales inmunizados con la vacuna inmunomodulada con PCM o la vacuna control (sin inmunomodulador), solo produjeron Acs detectables por la técnica ELISA (figura 7A y 7B), marcando una diferencia entre los mecanismos de acción entre las diferentes formulaciones.

Sabiendo que el primer eslabón en la inducción de la respuesta inmune humoral es la presentación del antígeno y conociendo que, la presencia de CPA es el mecanismo que media la prolongada respuesta humoral anti-VFA en los animales infectados, se analizó la capacidad de inducir CPA en los animales inmunizados con cada una de las diferentes formulaciones y si, la presencia del antígeno soluble, era necesaria para que las CPA puedan perpetuarse por largos períodos de tiempo

Los ensayos realizados demostraron que las CPA que provenían de animales infectados así como las obtenidas de ratones que fueron inmunizados con las diferentes formulaciones fueron capaces de inducir Acs detectables por ELISA.

La utilización del ensayo de doble transferencia (figura 22) demostró que la presencia de Ag circulante en el animal dador no es necesaria para el mantenimiento de las CPA (figura 24). Estos resultados son coincidentes con la continua presencia de CPA en los animales infectados (hasta los 365 días post-infección) en los cuales, como fue discutido anteriormente, no es posible encontrar antígeno viral ni partículas infecciosas.

Sin embargo, al igual que lo observado en la transferencia a receptores normales (figuras 7A y 7B), solamente los esplenocitos de animales infectados o inmunizados con la vacuna inmunomodulada con AVR indujeron Acs de tipo neutralizante en los ratones receptores presensibilizados (figura 20 B). Se podría esbozar, al menos, dos diferentes hipótesis para explicar este fenómeno. Una sería que, dependiendo del inmunomodulador utilizado, existiese una presentación diferencial del tipo de epitopes presentados. Alternativamente, el fenómeno podría deberse a una diferencia puramente de tipo cuantitativa en la cantidad de epitopes presentados

Para comenzar a dilucidar entre ambas posibilidades se utilizó un sistema de PA donde el antígeno a ser considerado es mucho más simple en términos de cantidad de determinantes antigénicos.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, sobre el mapeo de epitopes B y T de un péptido sintético conteniendo la secuencia aminoacídica entre los residuos 135-160 (P1) de la proteína VP1 del VFA O1 Campos, demostraron que P1 posee solo tres epitopes B y dos epitopes T (Zamorano, et. al., 1995). Sin embargo, los Acs anti P1 fueron suficientes para proteger a los animales contra el desafío con el virus homólogo.

En términos generales, es de destacar que al igual que con el virus inactivado, la capacidad de inducir Acs en los animales receptores normales correlacionó con el título observado en los animales dadores, siendo la intensidad del fenómeno dependiente de la masa de antígeno utilizado. Así, los esplenocitos extraídos de los animales inmunizados con dosis crecientes de P1 indujeron respuestas correlativamente incrementadas de Acs detectables primero, por ELISA y, posteriormente, por SN. Adicionalmente, células de dadores hiperinmunizados fueron capaces de inducir una vigorosa respuesta de Ac detectables por ambas técnicas tanto en receptores normales (hasta 180 d.p.t, tiempo que duró la experiencia -figura 27), así como en receptores presensibilizados. Estos resultados apuntalan la hipótesis que sostiene que las diferencias entre la inducción de anticuerpos neutralizantes y aquellos detectados solamente por ELISA puede ser meramente debida a la masa antigénica presentada.

Posteriormente, se analizó el efecto de los dos inmunomoduladores en un posible procesamiento diferencial de las distintas porciones de la secuencia 135-160. Los resultados demostraron que, en efecto, estas diferencias existen, ya que los patrones de reactividad demostrados por los sueros de los animales infectados e inmunizados con AVR resultaron similares y cualitativamente diferentes a aquellos presentados por los sueros de los animales inmunizados con PCM o el vehículo oleoso *per se* (figura 25). Esto sustentaría que, adicionalmente a un fenómeno de tipo cuantitativo, también existe un factor cualitativo como explicación a las diferencias encontradas en la respuesta humoral inducida en los animales receptores de células proveniente de dadores inmunizados con diferentes inmunomoduladores

La estrecha correlación entre la presencia y actividad de las CPA específicas para VFA, y los títulos de Acs observados en los animales que fueron estimulados antigenicamente de la forma mas diversa con (infectados experimentalmente o inmunizados con virus inactivo bajo muy diferentes condiciones), poderosamente sugiere que el mecanismo involucrado en el mantenimiento de la respuesta inmune es la presencia de CPA

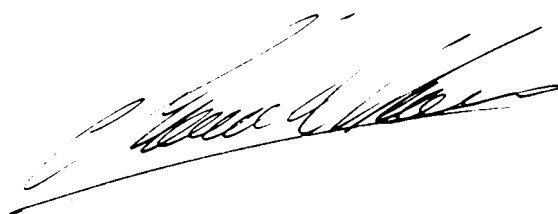
reestimulando en forma permanente la producción de Acs anti-VFA. Estos resultados son de importancia para el diseño y desarrollo de nuevas vacunas en las cuales se debería principalmente focalizar la atención en metodologías que estimulen la inducción y un eficaz mantenimiento de CPA específicas para VFA en los individuos vacunados.

CONCLUSIONES

VI CONCLUSIONES

- 1 - Se desarrolló una metodología que permite la detección funcional de CPA.**
- 2 - Se encontraron CPA tanto en animales infectados como en animales vacunados con virus inactivo.**
- 3 - Las células B de animales infectados o vacunados resultan suficientes para presentar el Ag eficientemente**
- 4 - La existencia de una respuesta activa de Acs anti-VFA correlaciona fuertemente con la presencia de células presentadoras de Ag.**
- 5 - La puesta a punto de esta metodología puede ser utilizada para establecer los mecanismos de acción de distintos inmunomoduladores.**
- 6 - Los animales inmunizados con la vacuna que posee AVR se comportan en las pruebas de PA de igual manera que los animales infectados**
- 7 - Las CPA se pueden mantener activas independientemente de la presencia de antígeno circulante.**

Se propone que la presencia de CPA es el mecanismo que media la prolongada respuesta humoral anti-VFA que se observa en animales que fueron infectados o inmunizados con altas dosis de virus inactivo o mediante la utilización de inmunomoduladores





BIBLIOGRAFÍA

VII BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K.; Haber, S. and Rock, K. L. (1985). Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. II. Specificity and properties of antigen-presenting B lymphocytes, and functions of immunoglobulin receptors. *J. Immunology* **135**:1661.

ABU ELZEIN, E.M.E. and Crowther, J. R. (1981). Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against FMDV from bovine sera using ELISA. *J. Hyg., Camb.* **86**:79.

ACHARYA, R.; Fry, E.; Stuart, D.I.; Fox, G.; Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å. *Nature*, **337**:709.

ADA, G.L. (1970). Antigen binding cells in tolerance and immunity. *Transplant. Rev.* **5**: 105.

ALEXANDER, H.; Koch, G.; Mountain, I.; Sprunt, K. and Van Sanne, O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on Hella cell monolayers. *Virology*, **5**:172.

ALKEMADE, S. (1988). Mycobacterial cell wall (MCW) and immune stimulation in animals. *Veterepharm files*.

ALLISON, A. (1973). Effects of adjuvants on different cell types and their interactions in immune responses. In *Immunopotential, CIBA Foundation Symposium N°18*, pp. 73. Ed. G.E.W. Wolstenholme and Knight Elsevier, Amsterdam.

AMADORI, M.; Archetti, I. L.; Verardi, R. and Berneri, C. (1992). Isolation of mononuclear cytotoxic cells from cattle vaccinated against foot and mouth disease. *Arch. Virol.* **122**:293.

ANDERSON, A.; Plotner, A. and Rubin, D. (1983). Effects of enteric priming with reovirus and lipodal amine adjuvant on mucosal lymphatic tissue and anti-viral IgA secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **409**:769.

ARLINGHAUS, R. and Polatnick, J. (1969). The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot and mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**:821.

ASCONAS, B. A. and Williamson A. R. (1972). Factors affecting the dinitrophenyl group. *Eur. J. Immunol.* **2**:487.

ASHWELL, J.D.; DeFranco, A.L.; Paul, W.A. and Schewartz, R.H. (1984). Antigen presentation by resting B cells: radiosensitivity of the antigen-presentation function and two distinct pathways of T cell activation. *J. Exp. Med.* **159**:881.

AUGE DE MELLO, P.; Honiman, M. and Gores, I. (1970). Further information on the survival of modified foot and mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **73**:489.

BACHRACH, H.; Trautman, R. and Breese, S.S. (1964). Chemical and physical properties of virtually pure foot and mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* **25**:333.

BACHRACH, H. (1968). Foot and mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **97**:659.

BACHRACH, H.; Morgan, D. and Moore, D.; Mc Kercher, P.D. and Polatnik, J. (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot and mouth disease virus. *J. Immunol.* **115**:1636.

BACHRACH, H. (1977). Foot and mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity. In: Romberger, Betsville Symposia in Agricultural Research I. Virology in Agriculture, 3-32. Ed. Allanheld-Osmiun, Montclair, NY.

BACHRACH, H.; Morgan, D. and Moore, D. (1979). Foot and mouth disease virus immunogenic capsid protein VPT: N-terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and tryptic cleavages. *Intervirology.* **12**:65.

BACHRACH, H.; Morgan, D.; McKercher, P.D.; Moore, D.M. and Robertson, B.H. (1982). Foot-and-mouth disease virus: immunogenicity and structure of fragments derived from capsid protein VP3 and of virus containing cleaved VP3. *Vet. Microb.* **7**:85.

BAHNEMAN, H.G. (1974). Binary ethylamine as an inactivant for Foot and Mouth Disease Virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* **47**: 47.

BARNETT, B.; Norval, M.; Howie, S.E.M. and Ross, J.A. (1987). Association of viruses with APCs: implications for the outcome of infections. *Microbiol. Sci.* **4(3)**:91.

BARTELING, S.; Mc Laen, R.; Wagenaar, F. and Gikkens, S. (1979). Isolation and characterization of trypsin-resistance O1 variants of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **43**:383.

BARTELING, S. and Vreeswijk, J. (1991). Developments in foot and mouth disease vaccines. *Vaccine.* **9**:75.

BAXT, B. and Bachrach, H. (1980). Early interactions of foot and mouth disease virus with cultured cells. *Virology.* **104**:42.

BAXT, B. and Bachrach, H. (1982). The adsorption and degradation of foot and mouth disease virus by isolated BHK-21 cells plasma membranes. *Virology.* **116**:391.

BAXT, B.; Morgan, D.O.; Robertson, B.H.; Timpone, C.A. (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.* **51**, N° 2 :298.

BAXT, B.; Vakharia, V.; Moore, D.M.; Franke, A.J. and Morgan, D. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **63**: 2143.

BECK, E.; Stomhmaier, K. (1987). Subtyping of european foot and mouth disease virus strains by nucliotide sequence determination. *Jornal of virology.* **Vol. 61**, N° 2: 298.

BEH, K. and Lascelles, A. (1985). The effects of adjuvants and prior immunization on the rate and mode of uptake of antigen into afferent popliteal lymph from sheep. *Immunology.* **54**:487.

BELING, C. (1953) The Beling FMD vaccine. *Bull. Off. Int. Epizoot* **39**: 103.

BERGMANN, I. E.; Augé de Mello, P.; Scodeller, E.A.; La Torre, J. L. (1988). Perspectives of genetic engineering vaccines against Foot and Mouth disease. Mem. Inst. Butantan **50**: 21.

BERINSTEIN, A.; Piatti, P.; Gaggino, O.P.; Schudel, A.A. and Sadir, A. M. (1991) Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium* sp. wall. Vaccine **9**, 883.

BERINSTEIN, A.; Pérez Filgueira, M.; Schudel, A.A.; Zamorano, P.; Borca, M. and Sadir A. M. (1993). AVR and LPS from *B.Ovis*: effect on the memory induced by FMDV vaccination. Vaccine **11**, 1295.

BERINSTEIN, A.; Roivainen, M.; Hovi, T.; Mason, P.W. and Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor inhibit binding and infection of foot and mouth disease virus to culture cells. J. Virology (en prensa).

BITTLE, J.; Houghten, R.; Alexander, H.; Shinnick, T.; Sutcliffe, J.; Lerner, R.; Rowlands, D. and Brown, F. (1982). Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature **298**:30.

BJORKMAN, P.J.; Saper, M.A.; Samraoui, B.; Bennett, W. S.; Strominger, J. and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I Histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature **329**:506.

BLAZCK, J. (1976). Kinetic and morphology of immune reaction cells in the splen studied using the immuno-cyto-adherence reaction. V. Secondary response and its modification by whole-body irradiation at different intervals following administration of antigen. Cesk Patol. **12**(4):209.

BOOTHROYD, J.; Highfield, P.; Cross, G.; Rowlands, D.; Lowe, P.; Brown, F. and Harris, T. (1981). Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequence in the structural protein genes. Nature. **290**:800.

BORCA, M.; Fernández, F.; Sadir, A. and Schudel, A. (1984). Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to foot and mouth disease virus (FMDV). Vet. Microbiol. **10**:1.

BORCA, M.; Fernández, F.; Sadir, A.; Braun, M. and Schudel, A. (1986). Immune response to foot and mouth disease virus in a murine model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* **59**:261.

BROOKSBY, J.B. (1982). Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology*. **18**:1.

BROWN, F. and Crick, J. (1958). Application of agar gel precipitation to the study of the virus of foot and mouth disease. *Virology*. **5**:133.

BROWN, F.; Cartwright, B. and Steward, D. (1962). Further studies on the infection of pig-kidney cells by foot and mouth disease virus. *Biochemistry and Biophysics*. **55**:768.

BROWN, F.; Hyslop, N. St. G.; Crick, J.; Morrow, A.W. (1963). The use of acetylenimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. Camb.* **61**: 37.

BROWN, F.; Cartwright, B. and Newman, J.F.E. (1964). Further studies of early antibody in the sera of cattle and guinea pigs infected with foot and mouth disease virus. *J. Immunol.* **93**:397.

BROWN, F. Review Lecture: Foot-and-mouth disease: one of the remaining great plagues. (1986). *Proc. R. Soc. Lond. B.* **229**:215.

BROWN, F. (1992). Review. *Vaccine*. **10**:1022.

BROWN, J.H.; Jardetzky, T.; Saper M. A.; Sampraoui, B.; Bjorkman, J.; and Wiley D., C. (1988). A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*. **332**:845.

BRUNER, D.; Gillespie, J. (1966). en *Hagen's Infectious Diseases of Domestic Animals*, Chp. **44**:791. Cornell Univ. Press Ithaca, N.Y.

BURROUGHS, J.; Rowlands, D.; Sangar, D.; Talbot, P. and Brown, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the foot and mouth disease virus particles. *J. Gen. Virol.* **13**:73.

BURROWS, R. (1966). Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Journal of Higiene. Cambridge.* **64**:81.

BURROWS, R. (1968). Excretion of foot and mouth disease virus prior to the development of lesions. *Vet. Res.* **82**:387.

BURTON, D. (1985). Immunoglobulin G, funtional sites. *Molec. Immunol.* **22**: 161.

BUTTNER, M. (1993). Review - Principles of paramunization. Options and limits in veterinary medicine. *Comp. Immun.Microbiol. infect. Disease* **16(1)**:1.

BÜÜS, S. and Wederling, O. (1986). A grup-specific inhibitor of lysosomal cystein proteinases selestively inhibit both proteolytic degradation and presentation of the antigen dinitrophenyl-poly-L-lysine by guinea-pig accessory cells to T cells. *J. Immunology.* **136**: 452.

CALLIS, J.J.; McKerber, P.D.; Graves, J.H. (1968). Foot-and-mouth disease Areview. *J. Am. Veterinary Medical Association.* **153, 12**:1798.

CAMPOS, M.; Bielefedt Ohmann, Rapin, N. and Babiuk, L.E. (1991). Demonstration of the in vitro antiviral properties of bovine lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Viral Immunol.* **4(4)**:259.

CARRILLO, E.; Giachetti, C. and Campos, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot and mouth disease virus replication. *Virology.* **135**:542.

CARRILLO, E. (1985). Replicación del virus de la fiebre aftosa. Estudio del mecanismo de penetración. Tesis doctoral. Fac. de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.

CASEY, T. and Unanue, E. R. (1990). The coestimulatory funcion of antigen-presenting cells. *Immunology Today.* Vol.**11**: 49.

CAVANAGH, D.; Rowlands, D.J.; Brown, F. (1978). Early events in the interaction between FMDV and primary kidney cells. *J.Gen. Virol.* **41**:255.

CENTRO PANAMERICANO de Fiebre Aftosa. Banco de Datos. 1972-1981.

CHARTEJEE, N.K.; Bachrach, H.L. and Polatnik, J. (1976). Foot and mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal poliriboadenilic acid and absens of amino acid binding ability. *Virology* **69**:369.

CHEDID, L.; Carelli, C. and Audibert, F. (1986). Use of adjuvants, antigens, and carriers in synthetic veterinary vaccines. In: *Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics*, The IOWA State University Press Chp. 5 pp. 51.

CHESNUT, R.W. and Gray, H.M. (1981). Studdies on the capacity of B cells to serve as antigen- presenting cells. *J. Immunology* **126**:1075.

CHEUNG, A.; DeLamatrter, J.; Weiss, C. and Cupper, H. (1983). Review. *J. Virol.* **48**: 451.

COLLEN, T.; Mc Cullough, K. and Doel T. (1984). Induction of foot and mouth disease virus in presensitized mouse spleen culture. *J. Virol.* **52**:650.

COLLEN, T.; DiMarchi, R. and Doel, T.R. (1991). A T cell epitope in VP1 of FMDV is immunodominant for vaccinated cattle. *J. Immunol.* **146**:749.

COLTER, J.; Bird, H. and Brown, F. (1957). Infectivity of ribonucleic acid from ehrlich ascites tumor cells infected with mengoencephalitic. *Nature.* **179**:859.

COON, J. and Hunter, R. (1975). Propierties of conjugated protein immunogens which selectively stimulate delayed-type hypersensitivity. *J. Immunology.* **114**:1518.

COOPER, P.; Agol, V.; Bachrach, H.; Brown, F.; Ghendon, Y.; Gibbs, A.; Gillespie, J.; Longberg-Holm, K.; Mandel. B.; Melnick, J.; Mohanty, S.; Povey, R.; Rueckert, R.; Schaffer, F. and Tyrrel, D. (1978). Picornaviridae: second report. *Intervirolgy.* **10**:165.

COSTA GIOMI, M.P.; Bergmann, I.E.; Scodeller, E.A.; Mello, P.; Augede; Gomes, I.; La Torre, J.L. (1984). Heterogeneity of polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: Biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidilic acid tracts of difference lenghts. *Journal of Virology.* **51**, N° 3 :799.

COSTA GIOMI, M.P. ;Gomes, I.; Tiraboschi, B.; Mello, P.A.; Bergmann, I.E.; Scodeller, E.A.; La Torre, J.L. (1988). Heterogeneity of polyribocytidilic acid tract in

aphthovirus: changes in the size of the poli (c) of viruses recovered from persistently infected cattle *Virology*. **162**: 58.

COTTRAL, G.; Galiunas, P. and Cox, B. (1968). Foot and mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch. Ges. Virusforsch.* **23**:362.

COTTRAL, G. (1975). Foot and mouth disease virus. In: *Foreign Animal Disease*, Third ed., Committee on Foreign Animal Diseases, United States Animal Health Association, Richmond, VA.

COWAN, K. (1968). Immunochemical studies of foot and mouth disease IV. Preparation and Evaluation of antisera specific for virus protein subunit and infection associated antigen. *J. Immunol.* **109**: 1183.

CROWELL, R.; Landau, B. J. (1979). Receptors as determinants of cellular tropism in picornavirus infection. In *Receptors and human disease*. Bean, A. G.; Chopin, P. (es). Jos. Macy Fdn. N.Y. pp. 1-33.

CROWLEY, M.; Inaba, K. and Steinman, R.M. (1990). Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *J. Exp. Med.* **172**:383.

CUNHA, R. and Eichorn, E. (1954). Influence of cortisone of susceptibility to foot and mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res* **15**:149.

CUNHA, R.; Junior, J.; Serraro, W. and Torruela, I. (1957). El uso de ratones lactantes en la evaluación de los Acs contra el virus de la fiebre aftosa y su significancia inmunológica *Gac. Vet.* **110**:234.

DAMLE, N.K.; Klussman, K.; Lisle, P.S.; Aruffo, A. (1992). Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM 1, LFA 3, and VCAM 1 on resting and primed CD4 + lymphocytes. *J. Immunol.* **148** (7): 1985.

DE SENA, J.; Mandell, B. (1977). Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characterization of the membrane-modified particle. *Virology.* **78**:554.

DENOYA, C.; Scodeller, E.; Giménez, B.; Vázquez, C. and La Torre, J. (1978). Foot and mouth disease virus I: Stability of its ribonucleic acid. *Virology*. **84**:230.

DIMARCHI, R.; Brooke, G.; Gale, C.; Cracknell, V.; Doel, T. and Mowat, N. (1986). Protection of cattle against foot and mouth disease by a synthetic peptide. *Science*. **232**:639.

DIMMOCK, N.J. (1984). Mechanisms of neutralisation of animal viruses *J. Gen. Virol.* **65**:1015.

DOBRANRAVOVA, N.N.; Mal'Tesev, VN. and Shal' Nova, G.A. (1983). Plasmocyte radiation in intact and irradiated mice after administration of native globulin and globulin irradiated by gamma rays. *Radiobiologia* **23**(4):534.

DOEL, T.; Gale, C.; Brooke, G. and DiMarchi, R. (1988). Immunization against foot and mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *J. Gen. Virol.* **69**:2403.

DORRINGTON, K. (1978). The structural basis for the functional versatility of the immunoglobulin G. *Can. J. Biochem.* **56**:1087.

EDELMAN, R. (1980). Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* **2**:370.

EIGEN, M. and Winkler, R. (1975) *Das Spiel. Naturgesetze Steuern den Zufall.* R. Piper and Co. Verlag.

ESCARMIS, C.; Toja, M.; Medina, M. and Domingo, E. (1992). Modification of the 5' and translated region of foot and mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res.* **26**:113.

ESSER, C. and Radbruch, A. (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Ann. Rev. Immunology.* **8**:717.

FAGG, R. and Hyslop, N. (1966). Isolation of variants strain of foot and mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. *J. Hyg.* **64**:397.

FAO- OIE- OMS. (1994). *Anuario de sanidad animal.*

FELDBUSH, T.L. (1973). Antigen modulation of the immune response. The decline of immunological memory in the absence of continuing antigenic stimulation. *Cell Immunol.* 8:435.

FERNANDEZ TOMAS, C. and Baltimore, D. (1973). Morphogenesis of picornavirus. Demonstration of a new intermediate, the provirion. *J. Virol.* 12:1122.

FERNANDEZ-MUÑOZ, R.; Darnell, J.E. (1976). Structural difference between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells : possible basis for the inhibition of host protein synthesis. *J. Virol.* 126:719.

FERNANDEZ, F.; Borca, M.; Sadir, A.; Fondevila, N.; Mayo, J. and Schudel, A. (1986). Foot and mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.* 12:15.

FINKELMAN, F.D.; Holmes, J.; Katona, I.M.; Urban, J.F.Jr.; Beckmann, P.; Park, L.; Schooley, K.A.; Coffman, R.L.; Mossman, T.R. and Paul, W.E. (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunology.* 8:303.

FINKELMAN, F.D.; Lees, A. and Morris, S.C. (1992). Antigen presentation by B lymphocytes to CD4 + T lymphocytes in "vivo": importance for B lymphocyte and T lymphocyte activation. *Seminars in Immunol.* 4: 247.

FORSS, S.; Steble, K.; Beck, E.; Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of Foot and mouth disease virus. *Nucleic Acic. Res.* 12:6587.

FOX, G.; Stuart, D., Acharya, R.K., Fry, E., Rowlands, D. and Brown, F. (1987). Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J. Mol. Biol.* 196:591.

FOX, G.; Parry, N.; Barnett, P.; McGinn, B.; Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot and mouth disease virus includes the amino acid sequence R-G-D (Arginine-Glycine-Aspartic acid). *J. Gen. Virol.* 70:625.

FRANCASTORIUS, H. (1546). De contagione et contagiosis morbis et curatione, bK1, chap.12 Venezia.

FRANCIS, M.; Ouldridge, E.J. and Black, L. (1983) Antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot and mouth disease virus disease vaccination and or exposure to lives virus. *Res. Vet. Sci.* 35 (2):206.

FRANCIS, M.; Fry, C.; Rowlands, D.; Brown, F.; Bittle, J.; Houghten, R. and Lerner, R. (1985). Immunological priming with synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 66:2347.

FREITAS, A.A. and Rocha, B.B. (1993). Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunology Today.* 14.1:25

FRENKEL, H. (1951). Research on foot and mouth disease II. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.*12:187.

FRY, E., Logan, D.; Acharya, R.; Fox, G.; Rowlands, D.; Brown, F.; and Stuart, D. (1990). Architecture and topology of an aphtovirus. *Seminars in Virology.* 1:439.

GALL, D. (1967). Observations on the proprieties of adjuvants. *Symp. Series Immunobiol. Stand.* 6:39.

GEBAUER, F.; De la Torre, J.; Gomes, I.; Mateu, M.; Barahona, H.; Tiraboschi, E.; Bergmann, I.; Auge de Mello, P. and Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot and mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.* 62:2041.

GLASS, E.J.; Oliver, R.A.; Collen, T.; Doel, T.R.; DiMarchi, R. and Spooner, R.L. (1991). CMH class II restricted recognition of foot and mouth disease peptides by bovine T cells. *Immunology* 74:594.

GOLDSTEIN, N.O.; Pardoe, I.V.; Burnes, A.T.N. (1976). Requierement of an adenylic acid segment for the infectivity EMC RNA. *J. of General Virol.* 31:271.

GOLINI, F.; Nomoto, A.; Wimmer, E. (1978). The genome-linked proteins of picornavirus I. Difference in the VPgs of encephallomyocarditis virus and poliovirus as evidence that genome linked proteins are virus-coded. *Virology.* 89:112.

GRAVES, J.H. (1963). Formaldehyde inactivation of Foot and Mouth disease virion RNA and processing of the primary cleavage products in rabbit reticulocyte lysate. *Virology*. **116**: 19-30.

GRAY, D. and Skarval H. (1988). B-cell memory is short lived in the absence of antigen. *Nature*. **336**:70.

GRAY, D. (1993). Immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:49.

GRIMALDI, M.; Meucci, O.; Scorziello, A.; Florio, T.; Ventra, C.; Di Mercator and Schettini, G. (1992). IL6 modulation of second messenger systems in anterior pituitary cells. *Life Sci.* **51(16)**: 1243.

GRUBMAN, M.; Robertson, B.; Morgan, D.; Moore, D. and Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **50**:579.

GUIDOS, C.; Wong, M. and Lee, K.C. (1984). A comparison of the stimulatory activities of lymphoid dendritic cells and macrophages in T proliferative responses to various antigens. *J. Immunology* **33**:1179.

GUPTA, R.K., Relyvd, E.H., Linbland, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., Gupta C.K. (1993). Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, **11**: 293.

HAMMARBACK, J.A. and Valle, R.B. (1990). Antibody exchange immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.* **256**: 12763.

HARRIS, T. J. R.; Brown, F. (1976). The location of poly (c) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **33**:493.

HEATLEY, R. and Strack, J. (1975). Immunogenicity of lipid-conjugated protein in the intestine. *Immunology*. **29**:143.

HOGLE, J.M.; Chow, M. and Filman, D.J. (1985). Three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. **229**:1358.

JENSEN, K. (1986). Synthetic adjuvants: AVR and other interferon inducers. In: *Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics*, The IOWA State University Press pp.79.

JOLLES, P. and Praft, A. (1973). Mechanisms of adjuvants activity. In: *Chemical and Biological Basis of Adjuvants: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Vol. 13 pp. 81.

KING, A.M.Q.; Underwood, B.O. ; McCohon, D.; Newman, J. W.; Brown, F. (1981). Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. *Nature* Vol. **293**: 479.

KITAMURA, N.; Sembler, B.; Rothberg, P.; Larsen, G.; Adler, C.; Dorner, A.; Emini, E.; Hanekac, R.; Lee, J.; van der Wert, S.; Anderson, C. and Winmer, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide repression of poliovirus RNA. *Nature*. 291:547.

KITSON, J.D.A.; Mc Cahon, D. and Belsham, G.J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* **179**: 26.

KLAUS, G.G.; Humphrey, J.H.; Kunkl, A. and Donworth, D.V. The follicular dendritic cells its rol in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev.* **53**:3-28, 1980.

KNUDSEN, R.; Groocock, C. and Andersen, A. (1979). Immunity to foot and mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune response. *Infect. Immunol.* **24**:787

KNUDSEN, R. (1982). Adjuvant effects of two formulations of CP- 20,961, a synthetic lipid amine, for foot and mouth disease virus vaccine in guinea pigs. OIE, Proc. 16th Conf. of the FMD Comission, Paris, pp. 179.

KOSZINOWSKI, U.H.; Reddehase, M.J. and Jonjic, S. (1991). The role of the CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* **3**:471.

KURT-JONES, E. A.; Liano, D.; Hayglass, K. A.; Benacerraf, B.; Sy, M. S. and Abbas, A.K. (1988). The role of the antigen B cells in T cells priming in vivo: studies of B cells deficient mice. *J. Immunology* **140**:3773.

KUTUBUDDIN, M., Simons, J. and Chow, M. (1992). Poliovirus-specific Major Histocompatibility Complex class I-restricted cytolytic T cell epitopes in mice localise to neutralising antigenic regions. *J. Virol.* **66**(10): 5967-5974.

KYEWSKI, B.A.; Fathman, C.G. and Rouse, R.V. (1986). Intrathymic presentation of circulating non-CMH antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cells differentiation. *J. Exp. Med.* **163**:231.

LEA, S.; Hernandez, J.; Blakemore, W.; Broccho, E.; Curry, S.; Domingo, E.; Fry, E.; Abu-Ghazaleh, R.; King, A.; Newman, J.; Stuart, D. and Mateu, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure.* **2**:123.

LEE, F. Y.; Nomoto, A.; Detjen, B. M.; Wimmer, R. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**:59.

LESCELLES, A.; Eageson, G.; Beth, K. and Watson, D. (1989). Significance of Freund's adjuvant antigen injection granuloma in the maintenance of serum antibody response *Vet. Immunol. Immunopathol.* **22**:15.

LEVIN, D.; Constant, S.; Pasqualini, T.; Flavell, R. and Bottomly, K. (1993). Role of the dendritic cells in the priming of CD4⁺ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J. Immunol.* **151**:6742

LIU, K.J.; Parikh, V.S.; Tucker, P.W. and Kim, B.S. (1993). Role of B cell antigen receptor in antigen processing and presentation. Involvement of the transmembrane region in intracellular trafficking of receptor/ligand complexes. *J. Immunology.* **151**: 6143.

LOEFFLER, F. and Frosh, P. (1897). Summarischer Bericht über der Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul - und Klauenseuche. *Zent Bl. Bakt. Parasitkde I.* **22**:257.

LOPEZ, O.; Sadir, A.; Borca, M.; Fernández, F.; Braun, M. and Schudel, A. (1990). Immune response to foot and mouth disease virus in an experimental murine model II: Basis of persistent antibody reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **24**:313.

LUCAS-LENARD, J.M. (1979). Inhibition of cellular protein synthesis after virus infection. In: *The molecular biology of picornaviruses*, edited by Perez-Bercoff pp. 73-79. Cambridge University Press, New York.

LUO, M.; Vriend, G.; Kramer, G.; Minor, I.; Arnannol, E. Rossman, M.G.; Boege, V.; Scraba, D.G.; Duke, G.M. and Palmemberg, A. (1987). The atomic structure of Mengo virus at 30 Å resolution. *Science* **235**:182.

MACKAY, C.R. (1993). Immunological memory. *Adv. Immunol.* **53**:217.

MARTINEZ- SALAS, E.; Saiz, J.C.; Davila, M.; Belsham, G.G. and Domingo, E. (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot and mouth disease virus leads to enhanced cap independent translation in vivo. *J. Virol.* **67**:3748.

MASON, P.W.; Baxt, B.; Brown, F.; Harber, J.; Murdin, A. and Wimmer, E. (1993). Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via Fc receptor. *Virology* **192**:568.

MASON, P.W.; Rieder, E. and Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot and mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 2210.

MATEU, M.G.; Martinez, M.A., Rocha, E., Andreu, D.; Parejo, J.; Giralt, E.; Sobrino, F. and Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5883.

MATEU, M.G.; Martinez, M.A.; Capucci, L.; Andreu, D.; Giralt, E.; Sobrino, F.; Brocchi, E. and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.* **71**:629.

MAY, R.M. Simple mathematical models with very complicated dynamics. *Nature* **261**:459-467, 1976.

MAYER, R.F.; Brown, C.C.; House, C.; House, J.A. and Molitor, T.W. (1991). Rapid and sensitive detection of foot and mouth disease virus by enzymatic RNA amplification or polimerase gene. *J. Virol. Methods.* **34**:151.

McCAULEY, E.; Aulahi, N.; Sundquist, W.; New, J and Miller, W. (1977). A study of the potential economic impact of foot and mouth disease in the U.S. *Proc. of United States Animal Health Assoc., 81st. Annual Meeting,* pp 284.

McVICAR, J. M.; Sutmoller, P. (1970). Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am. J. Epidemiol* **92**:273.

MELNICK, J.L. et.al. (1974). Picornaviridae. *Intervirology.* **4**: 303.

MELOEN, R.H. and Barteling, S.J.(1986). An epitope located at the C- terminus of isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus O induces neutralizing activity but poor protection. *J. Gen. Virol.* **67**:289.

MELOEN, R.H.; Puyk, R.; Meijer, D.; Lankhof, H.; Posthumus, W. and Scaaper, W. (1987). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **68**:305.

MITCHINSON, N.A (1971). The carrier effect in the secondary response to haptene protein conjugates II. Cellular cooperation . *Eur. J. Immunol.* **1**:18.

MORGAN, D.; Moore, D. and McKercher, P. (1980). Vaccination against foot and mouth disease. In: *New Developments with Human and Veterinary Vaccines.* Alan A. Liss, Inc., NY.

MORGAN, D.; Robertson, B.; Moore, D.; Timpone, C. and McKercher, P. (1984). Aphotoviruses: Control of foot and mouth disease with genetic engineering vaccines. Ed. E. Kouretak. Marcel Dekker Inc pp. 135.

MORGAN, D and Moore, D. (1990). Protection of cattle and swine against foot and mouth disease with byosinthetic peptide vaccine. *Am. J. Vet. Res.* **51**: 40.

MOSMANN, T.R. and Moore, K.W. (1991). The role of the IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Imm. Today* **12**:49.

MULCAHY, G.; Gale, C.; Robertson, P.; Iyisan, S.; Dimarchi, R.D. and Doel T. (1990). Isotype responses of infected, virus vaccinated and peptide vaccinated cattle to Foot and mouth disease virus. *Vaccine* **8 (3)**: 249.

NIBLACK, J.; Otternes, I.; Hermsworth, G.; Wolff, J.; Hoffman, W. and Kraska, A. (1979). CP-20,961: a structurally novel, synthetic adjuvant. *J. Reticuloendothel. Soc.* **26**:655.

O'SHEA, H.M.; Poh, K.K.; Tonks, P.; Brown, T.D.K. and Nash, A.A. (1992). Molecular pathogenesis of Theiler's virus variants. In: Abstracts of Europic '91'. University of Canterbury, Kent, England; E19.

OGRA, L.; Morag, A. and Tiku, M. (1975). Hummoral immune response to viral infections. *Vir. Immun. and immunopatology*. Ed. A.L. Notkins Ac. Press: 57.

OHTA, M.; Nakashima, I. and Kato, M. (1982). Adjuvant action of bacterial lipopolisaccharide in induction of delayed-type hypersensitivity to protein antigens. II. Relationships of intensity of the action to that of the other immunological activities. *Immunobiology* **163**:460.

OIE (1993). Informe final 61 sesión general

OUTLAW, M. C. and Dimmock (1991). Insights into neutralization of animals viruses gained from the study of influenza virus. *Epidemiol. Infect.* **106**:205.

PANAFTOSA (1993). Situación de los programas de control de la fiebre aftosa en América del Sur, 1992. OPS/ OMS/ Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

PARISI, J. M.; Giomi, P.C.; Grier, P.; Augé de Mello, P.; Bergmann, I.E.; La Torre, J.L. (1987) Biochemical characterization of an aphthovirus type O1 strain Campos attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. *Virology* **68**:523.

PARRY, N.R.; Ouldrige, E.J.; Barnett, P.V.; Rowlands, D.J.; Brown, F; Bittle, J.L., Houghton, R.A. and Lerner, A (1985). Identification of neutralizing epitopes of foot and mouth disease virus. *Vaccines 85*, Cold Spring Harbor Lab., N.Y. **211**.

PARRY, N.R.; Ouldrige, E.J.; Barnett, P.V.; Rowlands, D.J. and Brown, F. (1989). Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J.Gen.Virol.* **70:** 1493.

PENA ROSSI, C.; McAllister, A.; Fiette, L. and Brahic, R. (1991). Theiler's virus infection induces a specific cytotoxic T lymphocyte response. *Cell. Immunol.* **138:**341.

PEREIRA, H.G. (1981). Foot and mouth disease. *Virus disease of food animals.* E.P.J. Academic Press **2:** 333.

PEREZ BERCOFF, R. (1979). Replication of the viral RNA. In: Perez Bercoff (ed.) *The Molecular Biology of Picornaviruses,* Plenum, NY pp. 239.

PEREZ FILGUEIRA, D.M.; Berenstein, A.; Smitsaart, E.; Borca, M.V. and Sadir A.M. (1995) Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. *Vaccine***13(10):**953.

PEREZ FILGUEIRA, D.M. Efecto de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune al virus de la Fiebre Aftosa en un modelo experimental y en el huesped natural. (1996) Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas y naturales de la UBA.

PFAFF, E.; Thiel, H.J.; Beck, E.; Srtohmaier, K. and Schaller,H. (1988). Analysis of neutralizing epitopes on Foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **62:**2033.

PIATTI, P.; Berinstein, A.; López, O.; Borca, M.; Fernández, F.; Schudel, A. and Sadir, A. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot and mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* **72:**1691.

POLATNICK, J. and Bachrach, H. (1964). Production and purification of miligram amounts of foot and mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microbiol.* **12:**368.

PORTER, A.; Fellner, P.; Black, D.; Rowlands, D.; Harris, T., J. and Brown, F. (1978). 3' Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature.* **276:** 298.

PRATO MURPHY, M.; Rodriguez, M.; Schudel, A. A. and Mayer, R.F. (1995). Localization of FMDV RNA in tissue culture infected cells via in situ polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **54**:174.

PRINGLE, C. (1964). Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot and mouth disease virus strains. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **61**:619.

QUIAO, L.; Schurmann, G.; Betzler, M. and Mever, S.C.(1992). Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* **101**(6):1529.

REWEYEMAMU, M.; Umehara, O.; Medeiros Neto, R. and Schiappacassi, C. (1985). AVR: a new synthetic adjuvant for veterinary vaccines X° Congreso de Panamericano de Veterinaria y Zootecnia. V° Congreso Argentino de Cs. Veterinarias, Bs. As. Argentina.

RIVENSON, S.; Sadir, A.; Gaggino, O.; Marcovecchio, F.; Zabal, O.; Laporte, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidróxisaponinadas. *Rev. Med. (Bs. As.)*. **63**:364.

ROCK, K.L.; Benacerraf, B. and Abbas, A.K. (1984). Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunobulin receptors. *J. Exp. Med.* **160**:1102.

ROITT, I. (1991). in *Essential Immunology* seventh edition. Chapter **10**:206.

ROMAGNANI, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immun. Today* **12**:256.

RON, Y. and Sprent, J. (1987). T cell priming in vivo: a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes. *J. Immunology* **138** (9):2848.

ROSSI, M.; Sadir, A.; Schudel, A. and Palma, E. (1988). Detection of foot and mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal fluids. *Arch. Virol.* **99**:67.

ROSSMAN, M.G.; Arnold, E.; Erickson, J.; Frankelberg, E.; Griffith, J.; Hecht H.; Johnson, J.; Kramer, G.; Luo, M.; Mosser, A.; Rueckert, R.; Sherry, B. and Vriend, G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* **317**:145.

ROTH, J.A.; Kaeblerle, M.L.(1985).Enhancement of lymphocyte blastogenesis and neutrophil function by AVR in dexamethasone-treated and non-treated cattle. *Am J. Vet. Res.* **46(1):** 53.

RUBIN, D.; Anderson, A.; Lucis, D. and Michalek, S. (1983). Potentiation of the secretory IgA response by oral and enteric administration of CP-20,961. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **409:**866.

RUBMAN, M.; Robertson, B.; Morgan, D.; Moore, D. and Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot and mouth disease virus. *J. Virol.* **50:**579.

RUECKERT, R. (1985). Picornaviruses and their replication. In: *Virology*. Ed. B. Fields pp. 705. Raven press, N.Y.

RUECKERT, R. and Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* **50:**957.

RUHL, H.; Vogt, W.; Ruhul, U.; Bochert, G. and Schmidt, S. (1973). Effects of hydrocortisone treatment and whole body irradiation on mouse lymphocyte stimulation in vitro. *Immunology* **25(5):** 753.

RWEYEMAMU, M.; Umehara, O.; Lucca Neto, D.; Baltazar, M.; Vicente, F. and Medeiros Neto, R. (1986). Efficacy of AVR as an adjuvant for Newcastle disease virus antigen in chickens. *Am. J. Vet. Res.* **47:** 1243.

SADIR, A.; López, O.; Marcovecchio, F.; Tiraboschi, B.; Bergmann, I.; La Torre, J. and Schudel, A. (1988). The duration of immunity in cattle after experimental infection with foot and mouth disease virus. *Impacto de las Enfermedades Virales en el Desarrollo de Países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. 2ª Conferencia Internacional.* pp. 91, Mar del Plata, Argentina.

SAIZ, J.C.; Gonzalez, M.J.; Borca, M.V.; Sobrino, F. and Moore, D.M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *J. Virol.* **65:** 2518.

SALT, J. (1993). The carrier state in Foot and Mouth disease and immunological review. *Br. Vet. J.* **149:**207.

- SANGAR, D.V.** (1979). The replication of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **45**(1):1.
- SANGAR, D.V.**; Black, D.N.; Rowlands, D.J.; Harris T.J. and Brown, F. (1980). Localization of the initiation site for protein synthesis on Foot and Mouth disease virus RNA by in vitro translation of defined fragments of the RNA. *J. Virol.* **33**:59.
- SCHITTEK, B.** and Rajewsky, K. (1990). Maintenance of B-cell memory by long lived cells generated from proliferating precursors. *Nature.* **346**:749.
- SCHWARTZ, R.H.**; Fox, B.S.; Fraga, E.; Chen, C. and Singh, B. (1985). The lymphocyte to cytochrome c. V. Determination of the minimal peptide size required for stimulation of T cells clones and assessment of the contribution of each residue beyond this size to antigenic potency. *J. Immunology* **135**: 2598.
- SELLERS, R.F.**; Parker, J. (1969). Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Higiene, Cambridge.* **67**:671.
- SELLERS, R.F.** (1971). Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.* **41**:431.
- SEMLER, B.**; Anderson, C.; Kitamura, N.; Rothberg, P.; Wishart, W. and Wimmer, E. (1981). Poliovirus replication protein: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:3464.
- SEN, G.C.** and Ransohoff (1993). Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv. Vir. Res.* **42**:57.
- SENASA.** (1992-1994). Plan nacional de erradicación de la fiebre aftosa
- SHAHAN, M.** (1962). The virus of foot and mouth disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **101**:444
- SHIMONKEVITZ, R.**; Kappler, J.; Marrack, P. and Grey, H. Antigen recognition by H-2 restricted T cells. I Cell-free antigen processing. *J. Exp. Med.* **158** (2):303-316, 1983.
- SISSONS, J.G.** and Oldstone, M.B.A. (1980). Antibody mediated destruction of virus-infected cells. *Adv. Immunol.* **31**:1.

SPECTOR, D.H. and Baltimore, D. (1974). Requirement of 3'-terminal poly (adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71:2983.

SPRENT, J.; Schafer, M.; Hurd, M.; Surch, C.D. and Ron, Y. (1991). Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and maintain a virgin phenotype. J. Exp. Med. 174:717.

SPRENT, J. (1994). T and B memory cells. Cell Vol. 76:315.

STEIMAN, R.N. and Chon, Z.A. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II Functional properties in vitro. J. Exp. Med. 139:380.

STEINMAN, R.N.; Nogueira, M.; Witmer, M.; Tydings, J. and Melleman, I. (1980). Lymphokine enhances the expression and synthesis of Ia antigens on cultured mouse peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 152:1248.

STOKER, M. and Macpherson, I. (1964). Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivatives. Nature, 203:1355.

STRASSER, A.; Harris, A.W. and Cory, S. (1991). bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. Cell 67:889.

STREILEN, J.W. and Grammer, S.F. (1989). Langerhans cells can adopt to functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. J. Immunology. 143:3925.

SUBAK-SHARPE, H. (1961). The effect of passage, history, route of inoculation, virus strain and host strain on susceptibility of adult mice to the virus of foot and mouth disease. Arch. Ges. Virusforsch. 3:373.

SUBAK-SHARPE, H.; Pringle, C. and Hollom, S. (1962). Factors influencing the dynamics of multiplication of foot and mouth disease virus in adult mice. Arch. Ges. Virusforsch., 5:600.

SUTMOLLER, P.; Gaggero, C.A.; (1965). Foot and Mouth disease carriers. The Veterinary Record 77:968.

SUTMOLLER, P. and Mc Vicar J.W. (1976). Pathogenesis of foot and mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. Camb.* **77**:237.

TEW, J.G.; Kosco, M.H.; Burton, G.F. and Szakal, A.K. (1990). Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* **117**:185

THOMAS, A.; Woortmeijer, P.; Puijk, W. and Bartelling, S. (1988). Antigenic sites on foot and mouth disease virus type A10. *J. Virol.* **62**:2782.

UBERTINI, B.; Nardelli, L.; Dal Prato, A.; Panina, G. and Santero, A. (1963). Large scale cultivation of foot and mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. *Zbl. Vet. Med. B.* **10**:93.

UDHAYAKUMAR, V.; Goud, S. N.; and Subarao, B. (1988). Physiology of murine B lymphocytes. Life-spans of anti-u and haptenated Ficoll (thymus-independent antigen) reactive B cells. *Eur. J. Immunol.* **18**:1593.

UNANUE, E.R. (1981). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. II. Symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. *Adv. Immunology.* **31**:1.

UNANUE, E.R.; Beller, D.I.; Lu, C.Y. and Allen, P.M. (1984). Antigen Presentation: Commentson its regulation and mechanism. *J. Immunology* **132**:1

VAN BEKKUM, J.G.; Straver, P.J.; Bool, P. and Frenkel, S. (1959). Further information on the persistence of infective FMDV. *Tijdschrift voor Diergeneekunde* **84**:1159.

VAN BEKKUM, J.G.; Straver, P.J.; Bool, P.H. and Frenkel. (1966). Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull. Off. int. Epiz.* **65**:1949.

VAN BEKKUM, J.G. (1969). Correlation between serum antybody level and protecti;on against challenge with FMDV. Session of Research Group of the standing Technical Committee of European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease ,Brescia, Italy, FAO.

VAN DE WONDE, G.; Swaney, J.; and Bachrach, H. (1972). Chemical and physical properties of Foot and Mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **8**:1222.

VAN DE WONDE, G., Swaney, J. and Bachrach, H. (1972). Chemical and physical properties of foot and mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **8**: 1222.

VAN ROOIJEN, N. (1990). Direct intrafollicular differentiation of memory B cells into plasma cells. *Immunology Today* **11**:154.

VAN ROOIJEN, N. (1993). The role of FDC-retained immune complex network and its dynamics in the activity of germinal centers. *Res. Immunology* **144**:545.

VIDARD, L.; Rock, K. L. and Benacerraf, D. (1992). Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J. Immunol.* **149**:1905.

WALDMANN, O. and Pape, J. (1921). Experimentelle untersuchungen über maul- und Klauenseuche, I. Der verlauf der experimentellen maul- und Klauenseucheinfektion beim meerschweinchen. *Berl. tierarztl. wscr.* **37**:449.

WELLIVER, R.C. and Orga, P.L. (1988). Immunology of respiratory viral infections. *Ann. Rev. Med.* **39**:147.

WELSH, R.M. and Fitzgerald-Bocarsly, P. (1989). Antimicrobial defense by NK cells. In: *Natural Killer cells and host defence* (Eds Ades, E. W. and Lopez, C.). Karger, Basel, Switzerland; pp. 105.

WELSH, R.M. and Vargas-Cortes, M. (1992). Natural killer cells in viral infection. In: *The natural immune system: The natural killer cell* (Eds. Lewis, C. E. and O'D McGee, J.) IRL Press, Oxford, UK; Chp. 4:108.

WESSLEN, T. and Dinter, Z. (1957). The inactivation of Foot and Mouth disease virus by formalin. *Arch. ges. Virusforsch.* **7**: 394.

WILD, T.; Burroughs, J. and Brown, F. (1969). Surface structure of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **4**:313.

WINTHER, M.; Allen, G.; Bomford, R. and Brown, F. (1986). Bacterially expressed antigenic peptide from foot and mouth disease virus capsid elicits variable immunologic response in animals. *J. Immunol.* **136**:1835.

XIE, Q.C.; Mc Cahon, D.; Crowter, J.R.; Belsham, G.J. and Mc Cullough, K.C. (1987). Neutralization of foot and mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J.Gen. Virol.* **68**: 1637.

YILMA, T.; McVicar, J. and Breese, S. (1978). Pre-lytic release of foot and mouth disease virus cytoplasmic blebs. *J. Gen. Virol.* **41**:105.

ZAMORANO, P.; Wigdorovitz, A.; Chaer, M.; Fernandez, F. M.; Sadir, A. M. and Borca, M. (1994). Localization of B and T cell epitopes on a synthetic peptide containing the major immunogenic site of FMDV O1 Campos. *Virology* **201**:383.

ZAMORANO, P.; Wigdorovitz, A.; Perez-Filgueira, M.; Carrillo, C.; Escibano, J.M.; Sadir, A.M. and Borca, M. (1995). A ten amino acids linear sequence of VP1 of foot and mouth disease virus containing B and T- cell epitopes induces protection in mice. *Virology* .

ZIEGLER, K. and Unanué, E.R. (1981). Identification of a macrophage antigenic-processing event required for I region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunology* **127**:1869.