

## LENGUA AZUL: VACUNAS, INMUNOMODULADORES E INMUNIDAD PROTECTORA

P.J. SÁNCHEZ CORDÓN<sup>1\*</sup>, M. PEDRERA<sup>1</sup>, B. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, E. RUIZ-VILLAMOR<sup>3</sup>, M.A. RISALDE<sup>1</sup>, V. MOLINA<sup>1</sup>, L.M. GAYOSSO<sup>1</sup>, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO<sup>2</sup>, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS<sup>1</sup>

### RESUMEN

La Lengua Azul, está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), considerado como el virus prototipo de este género, del que se conocen al menos 24 serotipos diferentes, no todos patógenos, entre los que no existe inmunidad cruzada, lo que dificulta las estrategias de vacunación. En las dos últimas décadas, y más recientemente desde el verano de 2006, esta enfermedad ha provocado importantes pérdidas económicas, no sólo en las zonas de Europa periódicamente afectadas como los países de la cuenca Mediterránea, sino prácticamente en toda Europa. Los planes de vacunación puestos en marcha por las autoridades sanitarias, han revelado la existencia de reacciones adversas, así como la falta de protección de las vacunas en un elevado porcentaje de casos. En este trabajo pretendemos poner de manifiesto la importancia de conocer los mecanismos inmunológicos que se desarrollan tanto en animales infectados como en animales vacunados. Los mecanismos de acción de cada uno de estos serotipos varían completamente dependiendo de la especie y de la raza afectada. Hasta la fecha son escasos los trabajos *in vivo* que hayan centrado sus esfuerzos en una caracterización pormenorizada de los mecanismos patogénicos y de

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, España.

<sup>3</sup> Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España

\* E-mail: [an2sacop@uco.es](mailto:an2sacop@uco.es)

la respuesta inmune de cada uno de los serotipos patógenos en las principales especies afectadas por la enfermedad. Sólo con el conocimiento de los mecanismos de acción del virus y con el estudio de los mecanismos que controlan y modulan la respuesta inmune podremos desarrollar herramientas (nuevos adyuvantes, aplicación de inmunomoduladores, etc) que nos permitan mejorar las vacunas existentes, reduciendo las reacciones adversas que producen y potenciando su protección.

## INTRODUCCIÓN

La incursión del virus de la Lengua Azul (vLA) en la Europa Mediterránea inicialmente y en el norte de Europa a partir de 2006, ha provocado un considerable impacto económico negativo, tanto por las pérdidas económicas directas derivadas de la mortalidad de los animales y de la reducción de la productividad de las explotaciones afectadas, como por la prohibición total del transporte de animales entre regiones infectadas y no infectadas. Previamente a los brotes aparecidos en Europa, algunos estudios estimaban las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad entorno a unos 3 billones de dólares por año (1). Con el objetivo de limitar las pérdidas directas, de minimizar al máximo la circulación del vLA y de permitir el movimiento seguro de animales, las autoridades sanitarias de los países europeos afectados emprendieron la vacunación de la cabaña ganadera susceptible de la enfermedad acorde con sus políticas nacionales individuales, la distribución geográfica de los serotipos del vLA existentes y la disponibilidad de vacunas apropiadas (2).

En España, inicialmente la vacunación (con vacunas vivas modificadas, las únicas disponibles comercialmente en ese momento), sólo se aplicó a ovejas de las Islas Baleares (2001-2003) (2). Sin embargo, a consecuencia de los brotes de Lengua Azul (LA) detectados en el sureste de la Península Ibérica, desde el año 2003 se aplicó un Programa Nacional de Vigilancia y Control de la Enfermedad basado en estudios serológicos y entomológicos aleatorios. Esta vigilancia se reforzó mediante la vacunación de las especies susceptibles que pertenecían a las zonas restringidas y limítrofes de la enfermedad (3). Finalmente, en el año 2008 se establecieron los cuatro ejes principales de actuación del Programa de Control y Erradicación: vacunación obligatoria de los animales de las especies sensibles, vigilancia serológica, vigilancia entomológica e inspecciones clínicas en ganado ovino en todo el territorio español.

Las vacunas desarrolladas y aplicadas actualmente en la Unión Europea son **vacunas inactivadas**, las cuales muestran un elevado grado de seguridad y eficacia. Estas vacunas están desarrolladas a partir de virus genéticamente inerte, lo que im-

pide su replicación en los animales vacunados, así como la aparición de viremia, la recombinación de virus vacunal y de campo, la transmisión de virus por el vector y los posibles efectos teratógenos del virus en animales gestantes. Este tipo de vacunas confieren una intensa inmunidad protectora específica de serotipo de larga duración, requiriendo normalmente de la aplicación de dos dosis vacunales (2,4); actualmente también existen vacunas inactivadas bivalentes (5). Sin embargo, la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA), aunque parece teóricamente posible, aún no se ha conseguido con este tipo de vacunas, lo que condiciona el movimiento de animales. Entre las desventajas potenciales de estas vacunas destacan: (I) su elevado costo de producción; (II) la gran cantidad de antígeno necesaria para la vacunación; (III) la necesidad de inmunizaciones de refuerzo, ya que generalmente estas vacunas inactivadas inducen una inmunidad relativamente transitoria. Aunque estas vacunas son caras de producir y su uso es limitado, constituyen la mejor opción disponible en función de su eficacia/seguridad, si bien sólo están disponibles frente a algunos serotipos (6).

#### POSIBLES REACCIONES ADVERSAS DERIVADAS DE LA VACUNACIÓN FRENTE AL VLA

En distintas reuniones y foros científicos celebrados recientemente (*XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria y XXVII Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 2009*), se expusieron y discutieron una serie de aspectos relacionados con la vacunación de ovejas frente a los distintos serotipos del vLA incluidos en los programas de control y erradicación de la enfermedad. Dichos foros constataron, desde un punto de vista científico, un hecho que gran parte del sector ovino venía denunciando, y que estaba relacionado con la aparición de un **síndrome neurológico** asociado a una reacción adversa frente a las vacunas empleadas (serotipos 1 y 8 del vLA), que aparecía entre 4-6 días después de la vacunación en animales que habían recibido más de una dosis de vacuna. Este síndrome neurológico se caracterizó por la presencia de convulsiones, incoordinación, pedaleo, opistótonos, pérdida de visión (sin afectación del globo ocular), nistagmo, bruxismo e hipersalivación. Algunos de los animales que se recuperaban mantenían, durante algunos días, cierto grado de desorientación y apatía. Entre las lesiones encontradas destacó la presencia de una meningoencefalitis aguda, con presencia de manguitos perivasculares constituidos por neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y plasmocitos; además se observaron cambios vasculares (hiperemia, edemas y hemorragias) (7). En cuanto al porcentaje de incidencia no existe consenso. Así, mientras que el sector farmacéutico maneja cifras de

una incidencia casi insignificante (4 reacciones adversas/100000 dosis aplicadas en ovejas) (8), otras fuentes indican una incidencia mucho mayor con afectación de un elevado número de explotaciones (7).

Igualmente, numerosos rebaños ovinos repartidos por toda la geografía nacional, se han visto afectados por un **síndrome caquetizante crónico**. La sintomatología aparecía entre 7 y 60 días después de la administración de la última dosis de vacuna, normalmente en animales que habían recibido varias dosis. El cuadro clínico se caracterizó por presentar trastornos de tipo nervioso (inquietud, movimientos constantes de los animales encerrados, mordiscos a la lana de otras ovejas), pérdida de peso sin anorexia, disminución de la producción láctea y una fase final con ataxia, falta de respuesta a estímulos, postración sin convulsiones o pataleos y muerte. El mal aspecto de la lana, junto a la caquexia, hizo que los animales presentaran una mala condición corporal. Sin embargo, la ingesta de los animales afectados lejos de disminuir se mantuvo o incluso aumentó. Los animales tan sólo presentaron una atrofia serosa de la grasa y microscópicamente no se observaron lesiones de relevancia en el sistema nervioso central ni en ninguna otra localización (9). En cuanto a las cifras de incidencia, de nuevo no existe un acuerdo. Algunos trabajos señalan la afectación tanto de animales jóvenes como de adultos, llegándose a alcanzar una morbilidad de hasta el 80% y una alta mortalidad, especialmente a medida que avanzó el proceso (9). Datos procedentes de la industria farmacéutica señalaron que, pese a existir una baja incidencia (17 reacciones adversas/ 100000 dosis aplicadas en ovejas), se produjo una alta mortalidad que alcanzó hasta el 18.5% (8).

A la vista de estos resultados, parece obvio que estas reacciones adversas estuvieron relacionadas espacial y temporalmente con los procedimientos vacunales. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que inducen dichas reacciones. Además, estamos ante dos reacciones adversas totalmente diferentes. Así, mientras que el síndrome neurológico es un proceso agudo de cierto componente alérgico, en síndrome caquetizante crónico se manifiesta de manera insidiosa, desconociéndose por completo cuales son los mecanismos que interaccionan en su instauración.

Trabajos experimentales llevados a cabo (en ovino y vacuno) en condiciones de laboratorio controladas, previamente a la aplicación de las vacunas inactivadas en campo, pusieron de manifiesto su seguridad. Este tipo de vacunas no indujeron reacciones sistémicas relacionadas con la vacunación (fiebre, pérdida de peso, disfunciones reproductivas, etc), si bien algunas indujeron reacciones locales transitorias en el lugar de inoculación de importancia variable (media o moderada), con diferente frecuencia (de inusual a común), alteraciones que normalmente desaparecieron an-

tes de los 3 días tras su aplicación, y que sólo en algunos casos aislados persistieron durante 1-2 semanas (2).

## ASPECTOS GENERALES Y HETEROGENEIDAD DEL VLA

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial, que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes con importantes diferencias según las especies afectadas y que se incluye en la antigua lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), considerado como el virus prototipo de este género, del que se conocen al menos 24 serotipos diferentes, no todos patógenos, entre los que no existe inmunidad cruzada, lo que dificulta las estrategias de vacunación (10,11). Un nuevo serotipo, que sería el número 25, ha sido identificado recientemente (12,13). Hasta el momento, en Europa se han detectado los serotipos 1, 2, 4, 6, 8, 9, 15, 16, así como el posible nuevo serotipo 25 (14).

El virus de la Lengua Azul (vLA) se presenta como el modelo a seguir en el estudio de los *Orbivirus*, mostrando una importante capacidad de difusión y virulencia. A pesar de la gran variabilidad mostrada por las especies de virus del género *Orbivirus*, todos ellos muestran una serie de características comunes: (I) Cápside icosaédrica con dos capas de proteínas en la que se encuentran las proteínas estructurales VP2 y VP5, proteínas mayores de la capa externa que se pierde en la etapa inicial del proceso de infección, mientras que VP3 y VP7 son las principales proteínas de la capa interna, donde se localizan también las proteínas estructurales menores VP1, VP4 y VP6. Además de estas proteínas estructurales existen otras proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3A) que parecen participar en la replicación, maduración y salida del virus de la célula infectada; (II) El genoma del vLA está compuesto por 10 segmentos de ARN bicatenario empaquetados dentro de la cápside (15,16). Las proteínas VP3 y VP7, están altamente conservada en todos los *Orbivirus* (17,18), expresando determinantes antigénicos específicos de grupo (19).

Sin embargo, existen variaciones considerables entre cepas de campo del vLA, incluso entre las pertenecientes al mismo serotipo, lo que pone de relieve diferencias en las secuencias de nucleótidos de cada uno de los segmentos del ARN bicatenario del genoma del virus (20,21). La heterogeneidad entre las cepas de campo ocurre como consecuencia tanto de la deriva genética como del cambio genético, el último como resultado de la redistribución de los genes víricos durante infecciones mixtas en cualquiera de los hospedadores vertebrados e invertebrados del vLA (22). La

variación en la secuencia individual de genes ocurre a través de complejos procesos de deriva genética durante pasos alternos del virus en sus hospedadores rumiantes e invertebrados (23).

Por tanto, a la hora de afrontar el estudio de la LA, deberíamos considerar a cada uno de los serotipos patógenos que participan en la instauración de la enfermedad como agentes etiológicos independientes, capaces de inducir cuadros clínicos, lesiones, cambios inflamatorios y respuestas inmunológicas distintas unos de otros. Además, los mecanismos de acción de cada uno de estos serotipos varían completamente dependiendo de la especie (vacuno, ovino, caprino, rumiantes de vida silvestre) y de la raza afectada. Si hacemos una combinación de estas variantes, podremos comprobar que nuestros conocimientos sobre la enfermedad son limitados. Hasta la fecha son escasos los trabajos *in vivo* que hayan centrado sus esfuerzos en una caracterización pormenorizada de los **mecanismos patogénicos** (células blanco, mecanismos de difusión del virus, órganos de replicación y acantonamiento del virus, causas de los cambios vasculares) y de la **respuesta inmune** de cada uno de los serotipos patógenos en las principales especies afectadas por la enfermedad (evolución y papel de las distintas poblaciones celulares inmunocompetentes, mediadores químicos, proteínas de fase aguda, anticuerpos). Sólo con el conocimiento de los mecanismos de acción del virus y con el estudio de los mecanismos que controlan y modulan la respuesta inmune podremos desarrollar herramientas (nuevos adyuvantes, aplicación de inmunomoduladores) que nos permitan mejorar la vacunas existentes, reduciendo las reacciones adversas que producen y potenciando su protección.

## INMUNIDAD PROTECTORA FRENTE AL VLA

Tanto los mecanismos efectores de la respuesta inmune celular como humoral parecen capaces de proteger a las ovejas frente a la infección del vLA y a la enfermedad. Así, mientras que la **respuesta humoral** confiere una protección específica de serotipo, la **inmunidad celular** confiere protección heterotípica.

Estudios de transferencia pasiva de suero han demostrado que los **anticuerpos específicos** frente al vLA pueden conferir protección específica frente a un serotipo, sugiriendo un papel *in vivo* para la neutralización viral mediada por anticuerpos, cuyos mecanismos son desconocidos hasta la fecha pese a los intentos de demostrar, tanto en bovino como en ovino, una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o del complemento (24,25,26). Las proteínas externas del vLA VP2 y VP5 son las únicas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, siendo la VP2 la proteína mayor

involucrada en la especificidad de serotipo (27,28). Dependiendo de los serotipos, los anticuerpos pueden proteger frente a la infección de un número limitado de otros serotipos, mecanismo relacionado con la similitud de secuencias de la proteína VP2 (29). Los anticuerpos neutralizantes específicos de tipo frente a la VP2 y la VP7 persisten durante toda la vida del animal, mientras que los anticuerpos específicos de grupo frente a la VP7 persisten sólo durante 6-18 meses (30). Por tanto, los rumiantes infectados de manera natural con un serotipo del vLA muestran una inmunidad sólida de por vida al serotipo homólogo pero parcial o inexistente frente a otros serotipos heterólogos. Aunque las vacunas inactivadas inducen una rápida respuesta inmune, se han descrito niveles de seroconversión variables dependiendo de la raza de oveja inmunizada (31,32). Por tanto, dado que el nivel de anticuerpos neutralizantes provocado por la VP2 varía enormemente entre distintas especies de ovejas, la inclusión de los antígenos de ambas proteínas (VP2 y VP5) deberían tenerse en cuenta a la hora de desarrollar vacunas.

Distintos trabajos han constatado que, tras la vacunación, el nivel de anticuerpos neutralizantes no siempre se correlaciona con el grado de protección de los animales; además algunas vacunas inactivadas son capaces de conferir protección en ausencia de niveles detectables de anticuerpos neutralizantes. Se pone así en evidencia el papel de la **respuesta inmune celular** en la protección de los animales. Parece que la inmunidad mediada por células frente a la infección por el vLA en ovino es protectora y, de hecho, parece ser menos específica de serotipo que la respuesta humoral (24). Las ovejas que se recuperan de una infección por un VLA virulento muestran protección parcial cuando se enfrentan a un serotipo virulento heterólogo y protección completa si se infectan de nuevo, a pesar de la ausencia completa de anticuerpos neutralizantes demostrables, frente a los virus de la segunda y tercera infección (33).

Parece ser que son los linfocitos T CD4+ los efectores inmunes involucrados en la protección, aunque su contribución funcional directa aún no ha sido esclarecida. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CD4+) frente a los antígenos de las proteínas VP2 y VP5 confiere protección homóloga frente a un serotipo particular, mientras que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos frente a la proteína NS1 y las proteínas internas del núcleo inducen protección heteróloga (34,35). Sin embargo, la contribución funcional directa de estas células aún no ha sido esclarecida, y una vez más, los trabajos *in vivo* que profundizan sobre el papel de la respuesta inmune protectora (humoral y celular) en el transcurso de la LA son escasos.

## PERSPECTIVAS FUTURAS APLICABLES AL DESARROLLO DE VACUNAS: INMUNOMODULADORES Y CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES.

La vacunación, junto a la restricción de movimientos son los pilares básicos en el control de la LA. “*El Comité Europeo para el Control de la Eficacia, Seguridad y Calidad de los Productos Médicos Veterinarios*”, establece que la efectividad de las vacunas se determina principalmente en base a datos clínicos, virológicos e inmunológicos. Así, la capacidad de inmunización de una vacuna se evalúa mediante el análisis de la respuesta de anticuerpos después de cada inmunización, empleando para ello distintas técnicas (ELISA, seroneutralización). Además, los niveles de viremia tras la inoculación del virus en animales vacunados se considera como la forma más efectiva de determinar la eficacia de la inmunidad inducida por las vacunas, empleando para ello técnicas específicas como RT-PCR a tiempo real o aislamiento del virus (2). En resumen, la ausencia de signos clínicos locales o sistémicos, que exista una buena respuesta de anticuerpos específicos frente al virus y la ausencia de viremia, son los pilares básicos que determinan la eficacia de una vacuna, no profundizando en el estudio de otros parámetros inmunológicos fundamentales (evolución de mediadores químicos, respuesta inmune celular, etc).

Junto a las **vacunas inactivadas**, cuyas características básicas ya ha sido descritas, en la lucha contra la LA se dispone de otro tipo de vacunas como las **vacunas vivas atenuadas**, de gran eficacia inmunológica, pero actualmente en desuso debido a su bajo perfil de seguridad, pudiendo provocar efectos teratógenos, así como transmisión del virus vacunal a animales no vacunados. Otras vacunas a destacar son las **VLP (virus-like particles)**, complejos de proteínas estructurales (VP2, VP5, VP7) carentes de material genético (por tanto no replicativas) que se ensamblan formando estructuras semejantes al virus auténtico. Son muy seguras, permiten diferenciar animales vacunados de infectados (DIVA) y pueden proteger frente a distintos serotipos, por lo que serán las vacunas del futuro. Actualmente, su modo y coste de fabricación no las hacen viables para su comercialización (2,4,6).

Para la inactivación del vLA se emplean diferentes agentes químicos y radiaciones (formaldehído, beta-propiolactona, irradiación gamma, etc.). Asimismo, las vacunas inactivadas incluyen diferentes adyuvantes, destacando los excipientes acuosos (hidróxido de aluminio + saponinas) empleados en las vacunas desarrolladas para su aplicación en Europa por distintos laboratorios (4). La protección específica de serotipo que confieren estas vacunas, parece relacionarse con el papel clave que desempeña la proteína estructural VP2 en la inmunidad protectora mediada por células T y B. Sin embargo, como ya hemos indicado, no se conocen los mecanismos básicos que operan en los animales vacunados para conferirles protección, siendo muy escasos los estudios realizados.

Las **citoquinas** juegan un papel central en la naturaleza y regulación de la inmunidad protectora (36), así como en otros aspectos relacionados con la vacunación como el tráfico de células presentadoras de antígeno (CPA) entre el sitio de vacunación y los tejidos linfoides secundarios locales (37), sirviendo como adyuvantes efectivos, en distintos tipos de vacunas, de la respuesta celular y humoral frente a una amplia variedad de antígenos. Esta actividad adyuvante se traduce en una disminución de la diseminación de ciertos virus, así como en un incremento de los títulos de anticuerpos específicos y de la repuesta inmune protectora directa frente a ciertos antígenos (38).

Las citoquinas son polipéptidos cuya actividad funcional se basa en su elevada afinidad de interacción con receptores específicos localizados sobre poblaciones de células blanco. Esta interacción depende tanto de la secuencia primaria de aminoácidos como de la estructura terciaria de la citoquina en cuestión, de modo que una alteración tanto de la secuencia de aminoácidos como de la estructura terciaria puede tener consecuencias en la actividad de las citoquinas que, generalmente, se muestran bastante estables (38). Además, al contrario que otros adyuvantes que provocan dolor, inflamación y daño tisular en el lugar de inoculación, además de reacciones sistémicas como fiebre y retención en las canales de sustancias tóxicas (39), las citoquinas se presentan como adyuvantes menos agresivos. Gracias a la clonación de un gran número de citoquinas ovinas (la mayoría expresadas como proteínas recombinantes), y gracias a su estabilidad, seguridad y coste asequible, cada vez ha sido más frecuente su uso como adyuvantes en distintas estrategias de vacunación, donde se han demostrado los beneficios de su uso. Sin embargo, los mecanismos de protección permanecen sin aclarar. Para que el potencial de dichas moléculas sea optimizado se hace necesario, por tanto, conocer en profundidad dichos mecanismos inmunitarios efectores tanto en animales enfermos como vacunados. Dichos principios son aplicables al desarrollo de nuevas vacunas frente a los distintos serotipos del vLA. Así, una vez que se haya establecido el papel de ciertas citoquinas específicas en la respuesta del hospedador (ovejas, cabras, vacas y rumiantes salvajes) frente a un patógeno específico (distintos serotipos del vLA), será posible el diseño de terapias protectoras frente a dichos serotipos basadas en el empleo de citoquinas, o bien medidas preventivas para limitar el daño tisular inmunomediado.

Además, una vez que se establezca, *in vivo*, si la repuesta inmune protectora frente a los principales serotipos del vLA que pueden afectar a nuestra cabaña ganadera se debe al predominio de una respuesta inmune celular (Th1 en la que participan principalmente el  $\text{IFN}\gamma$ , la IL-2 y la IL-12) o humoral (favorecida por la respuesta inmune celular Th2 en la que predomina la producción de IL-4 e IL-10), así como el papel de las distintas citoquinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) en las lesiones y reacciones tanto de tipo local (edemas, hemorragias, necrosis musculares) como sistémico (fiebre, leucopenia, trombocito-

penia, alteración de los factores de coagulación), el uso selectivo de ciertas citoquinas podrá favorecer el incremento de la eficiencia de las vacunas aplicadas, objetivos que deben ser propuestos en los proyectos de investigación encaminados en esta línea.

Las **células dendríticas (CDs)** desempeñan un papel crucial en la generación de una respuesta inmune protectora tanto en enfermedades infecciosas como en procesos tumorales. Estas células son el blanco de diferentes virus, que las utilizan como mecanismo de difusión orgánica dado el potencial migratorio que poseen. Sin embargo, las CDs también cuentan con receptores que identifican proteínas o ácido nucleico vírico que les permiten iniciar una respuesta inmune innata antivírica (40), esencial para limitar la diseminación de ciertos virus. Además, las CDs producen citoquinas inflamatorias e IFNs en respuesta a la acción de los virus (41,42).

Dependiendo de la expresión de diferentes marcadores en su superficie, podemos distinguir distintas subpoblaciones de CDs, tanto circulantes en sangre y linfa como residentes en tejidos, las cuales se localizan a nivel intersticial, epitelial y en la piel. Así, las células dendríticas convencionales se dividen, a su vez, en células dendríticas inmaduras o indiferenciadas, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides (también conocidas como linfoides), las cuales se muestran como las principales productoras de IFN tipo I frente a virus (43). Tanto el fenotipo como la función de las CDs están regulados por un conjunto de mediadores solubles (citoquinas) que pueden igualmente promover la inmunidad o favorecer un estado de tolerancia. La principal función de las CDs radica en llevar a cabo “procesos de presentación de antígenos (propios o exógenos)”, desempeñando un papel fundamental de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Originadas en la médula ósea, las CDs inmaduras circulantes penetran en los tejidos en respuesta a citoquinas quimiotácticas inflamatorias. Al entrar en contacto con el antígeno extraño, las CDs sufren una serie de cambios morfológicos, así como una modificación de los receptores de superficie. Tras la captación y procesamiento del antígeno, las CDs migran a los nódulos linfáticos regionales, donde presentan el antígeno procesado a los linfocitos T, que generarán distintos tipos de respuestas (efectora, memoria, tolerancia) (44). Una vez finalizada la expresión de antígeno, estas células entran en apoptosis, posiblemente con el fin de regular una disminución de la intensidad de la respuesta inmune desarrollada (45). Así, en presencia de citoquinas antiinflamatorias (p.e. IL-10), las CDs permanecen inmaduras (con ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras), dando lugar a una tolerancia inmunológica mediante la no activación de linfocitos T. Sin embargo, en presencia de citoquinas proinflamatorias (p.e. IL-1, TNF, IL-12), las CDs maduran y expresan ciertas moléculas coestimuladoras que provocarán la activación de las células T y la inducción de inmunidad (46).

Por tanto, el conocimiento de las señales (especialmente citoquinas) necesarias para convertir una CDs en células presentadoras de antígeno capaces de inducir una respuesta

de células T apropiada, se considera un eje primordial para el desarrollo de nuevas vacunas frente al vLA. Se tienen pocos datos acerca de cómo la infección de las CDs por el vLA afecta a sus funciones y, en consecuencia, a la respuesta inmune, siendo necesario establecer una correlación entre los perfiles de citoquinas inducidos durante la infección y su relación con la estimulación o no de estas células. Este aspecto de la patogenia del vLA resulta crucial si se pretende potenciar, de forma eficiente, una respuesta inmune protectora mediante la aplicación de nuevos inmunomoduladores en la vacunas.

Tanto las células dendríticas foliculares como reticulares de distintos órganos linfoides en ovejas y cabras han mostrado signos de infección *in vivo* durante infecciones por el vLA (47). Trabajos *in vitro* recientes han demostrado que las células dendríticas convencionales (CDs) son células blanco primarias del vLA y que éstas contribuyen a la diseminación primaria del virus desde la piel a los nódulos linfáticos regionales. Dicho transporte tiene lugar justo antes de la aparición de la viremia y de los signos clínicos. En los nódulos linfáticos regionales, las CDs sufren la replicación de distintos serotipos del vLA. Además, parece que el virus favorece la llegada masiva de CDs desde la piel a los nódulos. Sin embargo, las funciones de las CDs no parecen verse afectadas. El vLA parece inducir en las CDs un incremento de moléculas de superficie coestimuladoras (CD80 y CD86) y la síntesis de citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria e inmune (IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-6), aunque contribuyendo en mucha menor medida a la instauración de procesos inflamatorios que las células endoteliales. Además, las CDs infectadas parecen capaces de estimular la proliferación de los linfocitos T CD4 y CD8, así como la producción de IFN $\gamma$  e IL-10. Todo ello pone de manifiesto una adaptación óptima del virus a estas células, lo que permitirá su diseminación primaria (48).

Trabajos *in vitro* demostraron, en ovino, que las células dendríticas aferentes de los nódulos linfoides, las cuales tienen su origen en las células dendríticas migratorias de la dermis, prolongaron su vida tras la administración de Factor estimulador de colonias recombinante ovino (rOvGM-CSF) y TNF $\alpha$  recombinante ovino (rOvTNF $\alpha$ ) de forma conjunta, siendo mayor el efecto que con la administración única de rOvTNF $\alpha$  (38,46).

Por tanto, la generación de una respuesta inmune efectiva se basa en una organización especializada de los órganos linfoides secundarios, apoyada en una red tridimensional de **células estromales y fibras reticulares**, la cual interactúa de una forma dinámica. Así, estas células estromales aportan importantes indicadores funcionales, como quimoquinas y citoquinas, con influencia sobre el medio ambiente y la supervivencia de las células inmunes. Esta red estromal está constituida por las células reticulares (CR), en las áreas T, y las células dendríticas foliculares (CDf) en los folículos linfoides (49), habiendo sido identificadas ambas poblaciones como células con signos de infección en el transcurso de la LA (47).

Las CDf, de origen indeterminado, mesenquimal o desarrolladas a partir de células precursoras migratorias (50), tienen como principal función la captación y presentación de antígenos en forma de inmunocomplejos a los linfocitos B (51,52), aunque el papel de estos inmunocomplejos en la respuesta de células B, en la funcionalidad del centro germinal, en la memoria inmune y en la inmunidad humoral prolongada no está determinada *in vivo*, existiendo datos contradictorios (53,54). Un área poco estudiada, y donde se han obtenido recientemente los primeros resultados, es la respuesta de las CDf a las citoquinas y a estímulos de la respuesta inmune innata, donde las CDf ajustarían su función (55).

Por tanto, el estudio de la **Respuesta inmune celular y humoral en animales infectados con distintos serotipo del vLA** (evolución de las poblaciones de células inmunocompetentes en el transcurso de la enfermedad, tanto en órganos linfoides como sangre; mediadores implicados en la regulación de la respuesta inmune a fin de establecer el tipo de respuesta inmune Th1 o Th2 predominante; estudio de los mecanismos que regulan los procesos de presentación de antígeno, activación de la respuesta celular y desarrollo de la respuesta humoral protectora) y en **animales vacunados** (evolución de células inmunocompetentes; mediadores químicos involucrados; mecanismos de regulación de la respuesta protectora; mecanismos patogénicos responsables de las reacciones adversas frente a la vacunación; aplicación de inmunomoduladores/adyuvantes en las vacunas para mejorar la protección y disminuir las reacciones adversas), son aspecto de la LA en los que se debe profundizar.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) a través del proyecto AGL2009-13174-C02-01. Pedro José Sánchez Cordón es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, (España).

## REFERENCIAS

1. Tabachnick WJ, Robertson MA, Murphy KE. Culicoides variipennis and bluetongue disease. Research on arthropod-borne animal diseases for control and prevention in the year 2000. Ann N Y Acad Sci. (1996) 791:219-26. Review
2. Savini G, Maclachlan NJ, Sánchez-Vizcaíno JM, Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. (2008) 31(2-3):101-20.
3. MAPA. Report of the efficacy test performed in Spain with different commercially available vaccine against BTV4 in cattle and sheep. MAPA report 2006.
4. Bhanuprakash V, Indrani BK, Hosamani M, Balamurugan V, Singh RK. Bluetongue vaccines: the past, present and future. Expert Rev Vaccines. (2009) 8(2):191-204. Review.

5. Savini G, Hamers C, Conte A, Migliaccio P, Bonfini B, Teodori L, Di Ventura M, Hudelet P, Schumacher C, Caporale V. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Vet Microbiol.* (2009) 133(1-2):1-8.
6. Schwartz-Cornil I, Mertens P.P.C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* (2008) 39: 46.
7. Badiola JJ, Bolea R, Marín B, Garza MC, Sarasa R, Vargas A, Acín C. Estudio de un síndrome neurológico como reacción adversa, asociado a la campaña de vacunación de lengua azul 2008-2009. XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo (2009) pp. 54.
8. Plana Durán J. Zulvac®: eficacia e inocuidad. Vacunas monovalentes BTV-1, BTV-8 y vacunas polivalentes BTV-1+8. Jornadas informativas FortDodge Animal Health. Pamplona (2009).
9. Luján L, Pérez M, Salazar E, Álvarez N, Badiola J, Fantova E. Síndrome caquetizante crónico del ovino ¿mito o realidad?. XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo (2009) pp. 72.
10. Mellor P.S., Wittmann E.J., Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001, *Vet. J.* (2002) 164:20-37.
11. Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H., Orbivirus, Reoviridae, In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus taxonomy*, VIIIth report of the ICTV, Elsevier/Academic press, London, UK, (2004), pp. 466-483.
12. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* (2008) 14(12):1855-61.
13. Chaignat V, Worwa G, Scherrer N, Hilbe M, Ehrensperger F, Batten C, Cortyen M, Hofmann M, Thuer B. Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet Microbiol.* (2009) 138(1-2):11-9.
14. Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis.* (2008) 14(4):539-44.
15. Roy, P. Orbivirus structure and assembly. *Virology.* (1996) 216: 1–11.
16. Rodríguez-Sánchez B, Iglesias-Martín I, Martínez-Avilés M, Sánchez-Vizcaíno JM. Orbiviruses in the Mediterranean basin: updated epidemiological situation of Bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. *Transbound Emerg Dis.* (2008) 55(5-6):205-14.
17. Roy P. Bluetongue virus proteins, *J. Gen. Virol.* (1992) 73:3051-3064.
18. Tan B.H., Nason E., Staeuber N., Jiang W., Monastyrskaya K., Roy P. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells, *J. Virol.* (2001) 75:3937-3947.
19. Anthony S., Jones H., Darpel K.E., Elliott H., Maan S., Samuel A., et al. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes, *J. Virol. Methods* (2007) 141:188-197.
20. Bonneau KR., Zhang N., Zhu J., Zhang F., Li Z, Zhang K et al. Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from United States and the People's Republic of China. *Virus Res.* (1999) 61:153-160.
21. Pritchard LL, Sendow I, Lunt R., Hassan SH., Kattenbelt J., Gould AR., et al. Genetic diversity of Bluetongue viruses in the south east Asia. *Virus Res.* (2004) 101:193-201.
22. Bonneau KR., MacLachlan NJ. Genetic diversification of field strains for bluetongue virus. *Vet. Ital.* (2004) 40: 446-447.
23. Bonneau KR., Mullens BA., MacLachlan NJ. Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep and cattle. *J. Virol.* (2001) 75: 8298-8205.

24. Jeggo M.H., Wardley R.C., and Brownlie J. A study of the role of cell-mediated immunity in blue tongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* (1984) 52: 403-410.
25. Jeggo MH, Wardley RC, Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res.* (1985a) 178:477-87.
26. Jeggo MH, Wardley RC. Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine.* (1985b) 3(1):57-8.
27. Roy P, Urakawa T, Van Dijk AA, Erasmus BJ. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J. Virol.* (1990) 64:1998-2003.
28. Lobato Z.L., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E., Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1997) 59:293-309.
29. Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PP. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol* (2007) 88:621-630.
30. Erasmus B.J. Bluetongue virus. In: Dinter Z., Morein B., editors. *Virus infections of ruminants.* (1990) Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. pp. 227-237.
31. Berry LJ, Osburn BI, Stott JL, Farver T, Heron B, Patton W. Inactivated bluetongue virus vaccine in lambs: differential serological responses related to breed. *Vet Res Commun.* (1982) 5(3):289-93.
32. Stott JL, Barber TL, Osburn BI. Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. *Am J Vet Res.* (1985) 46(5):1043-9.
33. Jeggo M.H., Gumm I.D., Taylor W.P., Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types, *Res. Vet. Sci.* (1983) 34:205-211.
34. Takamatsu H, Jeggo MH. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology.* (1989) 66(2):258-63.
35. Jones LD, Chuma T, Hails R, Williams T, Roy P. The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *J Gen Virol.*(1996) 77 (Pt 5):997-1003.
36. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today.* (1992) 13(10):379-81. Review.
37. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today.* (1992)13(3):93-100. Review.
38. Elhay M, Barcham G, Cameron A, Andrews A, Nash A. Recombinant Ovine Interleukin-1 $\beta$  as an adjuvant for multivalent bacterial vaccines. In: *Cytokines in Veterinary Medicine.* Eds. Schijns VECJ and Horzinek MC. (1997) Cab International.
39. Gupta RK, Relyveld EH, Lindbland EB, Bizzini B, Ben Efraim S, Gupta CK. Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* (1993) 11: 293-306.
40. Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., Biron, C.A. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* (2003) 197: 885-898.
41. Andoniou, C.E., van Dommelen, S.L., Voigt, V., Andrews, D.M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K.J., Trinchieri, G., Degli-Esposti, M.A. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol.* (2005) 10: 1011-1019.
42. Eisenächer, K., Steinberg, C., Reindl, W., Krug, A. The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity. *Immunobiology* (2008) 212:701-714.

43. Segura E and Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* (2009). 21:105-110.
44. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* (2000) 18:767-811. Review.
45. Shortman, K., Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:151-161.
46. Capone I, Rizza P, Belardelli F. Dendritic cells as targets and tools in vaccines. In: *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Eds. Virgil Schijns and Derek O'Hagan (2005). Academic Press. pp 17-33.
47. Sánchez-Cordón P.J., B. Rodríguez-Sánchez, M.A. Rialde, V. Molina, M. Pedrera, J.M. Sánchez-Vizcaíno, J.C. Gómez-Villamandos. Immunohistochemical detection of bluetongue virus (BTV) in fixed tissues. *J. Comp. Pathol.* (2010) (en prensa).
48. Hemati B, Contreras V, Urien C, Bonneau M, Takamatsu HH, Mertens PP, Bréard E, Sailleau C, Zientara S, Schwartz-Cornil I. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J Virol.* (2009) 83(17):8789-8799.
49. Mueller SN, Ahmed R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev.* (2008) 224:284-294. Review. Erratum in: *Immunol Rev.* (2008) Oct; 225:333.
50. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Imán PL et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* (2000) 176:181-193.
51. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, (1994)12:117-39.
52. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* (1997) 156:39-52.
53. Haberman, A.M., Shlomchik, M.J. Reassessing the function of immunocomplex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:757-64.
54. Kosco-Vilbois, M.H. Are follicular dendritic cells really good for nothing?. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:764-9.
55. Allen, D.C., Cyster, J.G.. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Seminars in Immunology* (2008) 20:14-25.

