

Respuesta Inmune y vacunas contra la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina

RODAS JD MV.MS., OSSA JE MV.PHD., ZULUAGA FN MV. MS*

Resumen

Como es bien sabido el virus de la RIB es un agente inmunosupresor seriamente implicado en la presentación del síndrome conocido como "fiebre de embarque" debido a su capacidad para reducir las funciones antibacterianas de los macrófagos y polimorfonucleares y por su poder lítico sobre los linfocitos T activados.

Desde la década de los 60 han existido las vacunas contra la RIB sin embargo aún no se ha logrado la producción de una vacuna que sea realmente efectiva y segura. En la actualidad las técnicas moleculares como la clonación y los sistemas de expresión génica han permitido el desarrollo de nuevas alternativas para la inmunización contra la RIB.

Este artículo revisa los aspectos más relevantes de la respuesta inmune específica e inespecífica contra el HVB-1, así como los mecanismos de inmunosupresión ejercidos por el virus y los avances en el desarrollo de nuevas vacunas.

Introducción

Así como ocurre con una gran cantidad de infecciones virales y bacterianas en los animales domésticos la respuesta inmune contra el Herpesvirus Bovino-1, constituye un factor determinante en el control y en la prevención de la infección y de su diseminación.

Por un lado se debe considerar la infección natural en la cual intervienen una gran variedad de elementos del sistema inmune, el cual desarrolla desde una respuesta inicialmente inespecífica hasta la elaboración de unos mecanismos de defensa específicos celulares y humorales, que si bien controlan la infección aguda e inducen una memoria inmunológica apropiada, son insuficientes para eliminar totalmente el agente del hospedero y para impedir la reinfección natural debido a una escasa protección de las mucosas.

De otro lado es importante anotar que la respuesta

inmune ocurre también como una reacción del organismo ante la inoculación artificial del virus mediante de la vacunación.

Una vacuna, idealmente, debería inducir una respuesta inmune tan duradera y específica que permitiera prevenir o cuando menos controlar una posible futura infección de los animales.

Sin embargo, las vacunas desarrolladas contra la RIB hasta el presente, solo disminuyen la severidad de la enfermedad y la magnitud de las epidemias.

Debido a la relevancia de este tema nos propusimos en el presente artículo hacer una revisión de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos y de los diferentes elementos que los componen. Se consideran también los diferentes tipos de vacunas que han sido utilizadas para tratar de prevenir esta infección y se muestran las diferentes alternativas de productos inmunizantes.

* Programa de Reproducción, Laboratorio de virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia

1. Respuesta inmune

La diseminación del HVB-1 en las secreciones nasales de los bovinos sugieren que la respuesta inmune inespecífica es la más importante durante las primoinfecciones respiratorias agudas, mientras que ambas, la inespecífica y la específica, son igualmente importantes para proteger a los bovinos de las infecciones secundarias o las reactivaciones del virus latente (30,32).

Las defensas no específicas incluyen el interferon alfa (IFN- α), macrófagos, células asesinas naturales (NK) y granulocitos polimorfonucleares neutrófilos. Las defensas específicas son mediadas por linfocitos T y anticuerpos. Sin embargo los mecanismos inmunes están tan frecuentemente interrelacionados que es casi imposible disociar sus efectos. Por ejemplo el IFN- α el cual es producido por linfocitos T activados, es capaz de estimular la actividad de células NK, de modo que, aunque puede hablarse de mecanismos inmunes específicos y no específicos, deben considerarse las múltiples interacciones que pueden existir entre sus diferentes componentes (43).

Los mecanismos inmunes contra la RIB pueden ser clasificados de acuerdo con su tiempo de aparición después de la infección.

En el caso de la infección respiratoria con HVB-1, puesto que la infección ocurre en el tracto respiratorio superior, la primera barrera de defensa que el virus encuentra está formada por los anticuerpos neutralizantes locales en el moco nasal para prevenir la diseminación en el sistema respiratorio. Sin embargo, si los anticuerpos mucosales son incapaces de neutralizar el virus ocurre la replicación en las células epiteliales induciendo la producción de un gran número de viriones. La infección se generaliza entonces a través de viremia, diseminación neural y transmisión célula a célula. En este momento se ha desarrollado una respuesta inflamatoria que produce edema, infiltración linfocitaria de la lámina propia y acumulación de macrófagos y polimorfonucleares (10).

Respuesta inmune inespecífica: las respuestas no específicas son mediadas por células que no tienen una "memoria" antigénica tales como los neutrófilos,

macrófagos o células NK. Se sabe que estos elementos actúan en conjunto durante diferentes momentos en el curso de la infección para promover la recuperación y asegurar que los animales estén mejor protegidos en caso de una infección secundaria (40).

Interferón (IFN- α): Cinco horas después de la infección con el HVB-1, el IFN- α , producido por los leucocitos presentes en el sitio de la inflamación es detectado en secreciones nasales alcanzando un pico máximo a las 72-96h posinfección y persistiendo por 8 días. Aunque el HVB-1 no es altamente susceptible a la acción directa de dicho IFN, éste provee la protección local temprana por modulación de la migración leucocitaria y de la fagocitosis, así como un aumento en la actividad de las células NK. Adicionalmente, la exposición de macrófagos al IFN- α , los hace resistentes a la infección con el HVB-1 y eleva su capacidad para funcionar como efectores de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por incremento del número de receptores Fc para las Igs G (2).

Macrófagos: la interacción del HVB-1 con células del sistema monocito/macrófago ocurre tempranamente durante el proceso infeccioso y parece jugar un papel central en todos los aspectos de las interacciones entre el hospedero y el virus (40).

Las infecciones in vitro de los macrófagos con este virus se ha visto que limitan su capacidad de secretar citoquinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y participar en la ADCC (43). Sin embargo los monocitos y macrófagos obtenidos de animales infectados producen IFN- α para funcionar activamente como células citotóxicas y expresar niveles aumentados de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II, confirmando la integridad funcional de estas células durante la infección (10).

Durante las primeras etapas de la infección el macrófago es uno de los mayores productores de INF- α , citoquina ésta que, aparte de inducir un estado antiviral en células no infectadas, regula las actividades efectoras de los PMN, células NK y macrófagos e influye sobre el patrón de movilidad de los linfocitos T,

actividades que limitan la replicación viral y permiten que se desarrollen otras funciones efectoras para contribuir a la total recuperación. Una vez la respuesta de las células T y B se ha iniciado, las funciones efectoras del macrófago se hacen más directas participando por ejemplo en la ADCC y en la eliminación de células infectadas con el virus. Esta actividad posterior es detectada en sangre periférica 5-7 días después de la infección y requiere la producción de IFN- γ por células T. Los blancos de acción citolítica de los macrófagos no han sido identificados hasta el presente (43).

La capacidad de los macrófagos para producir citoquinas que promuevan la infiltración leucocitaria y su participación en la lisis de células infectadas con el virus podría también ser considerado como un cofactor en el desarrollo de cambios patológicos asociados con la enfermedad (4).

Polimorfonuclear Neutrófilos (PMN): Los primeros trabajos sobre el estudio de la patogénesis de la enfermedad respiratoria bovina mostraron que la infiltración del parénquima pulmonar por PMN es una respuesta temprana a la infección por el HVB-1. Estos experimentos también demostraron que la eliminación de la *Pasterella haemolítica* por los PMN fue retardada en los animales infectados con el virus (18).

Estos resultados identificaron dos características mayores de las interacciones HVB-1/PMN que han sido confirmadas a través del curso de subsecuentes trabajos. La primera de estas características se relaciona con la capacidad de la infección con el virus para atraer PMN y activar funciones selectivas de estos (38).

In vitro, los PMN tratados con el antígeno del HVB-1 son capaces de producir una sustancia antiviral conocida como "poliferón", la cual es capaz de inhibir la replicación viral muy activamente sugiriendo que pronto después de la infección, los PMN contribuyen a los esfuerzos del hospedero para inhibir la replicación viral. La producción de esta molécula, la cual tiene una actividad semejante a la del IFN, no ha sido documentada *in vivo*. Sin embargo la producción de poliferón puede ser bloqueada con anticuerpos

específicos de glicoproteína viral, e *in vitro*, la interacción de los PMN con otros virus bovinos tales como el PI3, el VRSB y el VDB, falla para inducir esta proteína, sugiriendo que su producción es dependiente de una interacción específica de este virus con los PMN (5).

La segunda característica en cuanto al comportamiento de los PMN en relación a la infección con el HVB-1, refleja una reducción de las funciones antibacteriales; así por ejemplo se ha observado que los PMN recuperados de animales infectados con el HVB-1 tienen una reducida capacidad quimiotáctica y fagocítica (10).

Se ha sugerido que esta disfunción inducida directamente por el agente, predispone a los animales a las infecciones secundarias. Sin embargo también ha sido demostrado que la deleción selectiva de PMN aminora las manifestaciones clínicas de la neumonía fibrosa inducida por el desafío con la *P. haemolítica*, sugiriendo que los PMN también están asociados con las manifestaciones patológicas de la enfermedad respiratoria bovina (10,40).

Adicionalmente a las actividades antes mencionadas, se ha observado que los PMN son los mediadores más activos de la ADCC. En presencia de anticuerpos, los PMN matan muy efectivamente las células infectadas con el HVB-1 y esta actividad puede ser posteriormente potenciada por la adición del complemento (43).

La relevancia *in vivo* de esta reacción no ha sido totalmente demostrada aunque se ha postulado que esta actividad citotóxica juega un papel importante en la destrucción de células infectadas con el virus. Esto podría ser especialmente crucial en animales jóvenes que poseen bajos niveles de anticuerpos pasivos, por lo cual la replicación del virus debe ser limitada por ADCC aún antes de que la respuesta inmune específica sea disparada (40).

Células NK y respuesta semejante a la de las células NK: En general los sistemas citotóxicos pueden ser divididos en aquellos que requieren activación y aquellos que pueden ser detectados en la ausencia de activación. La interrelación entre estos dos sistemas no ha sido establecida (20).

Debido a las dificultades en demostrar la actividad clásica de las células NK en bovinos, los primeros estudios examinaron la capacidad de diferentes condiciones de cultivo para inducir las poblaciones efectoras con actividad citotóxica contra las células infectadas con el HVB-1. Varios sistemas de cultivo generaron células citotóxicas capaces de matar células infectadas con el virus. De estos, los sistemas mejor caracterizados, describían una población de linfocitos CD2+, CD4- y CD8 - capaces de adquirir función citotóxica luego de la activación con la IL-2; La relevancia funcional de esta actividad fue posteriormente establecida por la demostración de la capacidad de linfocitos vírgenes activados por la IL-2 para reducir la replicación viral (40).

Usando células tumorales xenogénicas y alogénicas infectadas con el HVB-1, se demostró que las células mononucleares de sangre periférica (MNSP) no estimuladas, obtenidas a partir de animales inmunes y no inmunes mataban preferencialmente células infectadas con el virus. En este sistema se demostró que la citotoxicidad era dependiente de la expresión de glicoproteínas virales (29).

Un análisis posterior de esta actividad demostró que células bovinas semejantes a las NK eran capaces de lisar células transfectadas con las gp I (gB) y gp IV (gD), pero no con gp III (gC). Estos hallazgos sugieren que la actividad semejante a NK mediada por linfocitos que carecen de marcadores para células T o B o macrófagos es antígeno dependiente (14).

Adicionalmente si uno considera el papel de estas glicoproteínas en la interacción entre las membranas del virus y de la célula hospedero, una hipótesis atractiva podría explicar la interacción entre las células NK y las células blanco infectadas con el HVB-1. Gp I y Gp IV están involucradas en adherencia y penetración viral, un proceso que involucra la fusión entre la membrana celular y la envoltura del virión (35). Así cuando estas proteínas son expresadas en la superficie celular uno puede esperar que ellas jueguen un papel importante en las interacciones célula-célula (10).

En efecto, las células transfectadas con gp I han mostrado que inducen fusión celular espontánea, mientras que, la gp III, que funciona como la mayor

proteína viral de adherencia interactuando con receptores semejantes a la heparina en la superficie celular, no está involucrada en los procesos de penetración. Otro interesante rasgo es que las mismas gp I y IV expresadas en la membrana celular promueven la interacción con PMN conduciendo a la liberación del poliferón. Por lo tanto, se puede especular que el mismo receptor que esta interactuando con gp I o gp IV, está presente en células NK y PMN y que un mecanismo similar es responsable por la inducción de la actividad tanto de las células NK como de los PMN (5).

La presencia de productos virales en la superficie de la célula blanco se ha considerado importante para el reconocimiento por las células NK en una variedad de sistemas. Sin embargo en estos sistemas la incapacidad de los anticuerpos antivirales para inhibir la lisis por las células NK, introduce la necesidad de otras explicaciones. Más aún, los antígenos estructurales del virus abandonados en la membrana celular durante el proceso de penetración, principalmente de los tipos gp I y IV, no inducen lisis por células NK. Tales observaciones pueden estar de acuerdo con la teoría "missing self" de reconocimiento por células NK (28). Posiblemente, la infección con el HVB-1, así como la transfección de genes de la gp, provea las células blanco con péptidos virales, los cuales pueden ocasionar desplazamiento de péptidos propios desde las moléculas del CMH-I. El desplazamiento de péptidos propios se ha observado en células infectadas con VHS. De acuerdo a una hipótesis previamente sugerida, la incorporación de péptidos no propios dentro de las moléculas del CMH-I puede hacer a las células infectadas sensibles a la lisis por células NK (26).

Respuesta Inmune Específica: tanto la respuesta citotóxica como la respuesta proliferativa de los linfocitos T (LT) son estimuladas después de la infección con el HVB-1 y aparecen en sangre periférica aproximadamente 8 días después de la infección. Puesto que su presencia es detectada en el momento o inmediatamente antes de que sanen las lesiones, ellas son consideradas efectivas en el proceso de recuperación de la infección o recrudescencia de la enfermedad después de la reactivación. Se considera

que los LT que infiltran tejido juegan un papel importante en la eliminación de las infecciones locales por el VHS (10).

Los mecanismos en los cuales los linfocitos ayudan a la recuperación pueden involucrar tanto actividad directa, por citotoxicidad mediada por LT citotóxicos (LTC), como actividad indirecta a través de la liberación de citoquinas tales como IL-2 ó IFN- γ (12).

Linfocitos T ayudadores: hasta la fecha, cuatro proteínas han mostrado ser reconocidas por los linfocitos T ayudadores del sistema inmune bovino: gI, gIII, gIV y Vp8 ó proteína mayor del tegumento. Para algunas de las anteriores gp se han descubierto los epítopes reconocidos por los LT, en la gp III por ejemplo, se han encontrado dos de ellos entre los aminoácidos 214-298 y 341-429 y en la gp IV uno entre los aminoácidos 78-157. De esta forma existe ahora la posibilidad de caracterizar el reconocimiento por las células T de estas importantes gp virales y sus respectivos epítopes para un gran número de animales. Estos datos ayudarán a determinar en un futuro, el grado de conservación antigénica dentro de una población de animales infectados y proveerá información con relación a si los animales producen una respuesta inmune preferencial que caracterice la protección del hospedero a la enfermedad producida por el HVB-1 (27).

Linfocitos T citotóxicos (LTC): algunos estudios también han demostrado la presencia de linfocitos T CD8+ restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), específicos del HVB-1, en bovinos inmunes. Se ha demostrado que las glicoproteínas III y IV son los antígenos blanco reconocidos por los linfocitos T citotóxicos CD8+ (61). También se ha observado que la estimulación secundaria in vitro de dichos LTC, puede ser diferencial dependiendo del método de presentación antigénica, por ejemplo, LTC obtenidos a partir de animales inmunes los cuales habían sido estimulados con el HVB-1 irradiado con luz ultravioleta, lisaron predominantemente células blanco expresando gp III, mientras que los fibroblastos autólogos infectados con

el HVB-1 estimularon principalmente LTC específicos de gp IV. Esta observación podría ser explicada por una diferente vía de procesamiento de antígenos del HVB-1. Los fibroblastos autólogos infectados presentan epítopes del HVB-1 en asociación con moléculas del CMH-I, pero el HVB-1 inactivado por luz ultravioleta es procesado y presentado por otro tipo de células en cultivo, probablemente macrófagos (9).

La presentación diferencial por distintos tipos de células se ha descrito en otros sistemas. Sin embargo en este estudio, la clonación de CTL específicas de gp III y gp IV parece necesaria para definir posteriormente las diferencias en el procesamiento y la presentación del HVB-1 por fibroblastos y macrófagos (10).

Linfocitos B: la caracterización de la especificidad de anticuerpos durante la infección primaria ha mostrado que tres de las gp de superficie (I, II y IV) son los primeros inductores y blancos para la respuesta de las células B. Esta respuesta parece ser expandida después de la reactivación o la infección secundaria. En estas situación, los niveles de anticuerpos a las gp mayores se incrementan y las respuestas a las gp menores tales como la gp E se hacen indetectables (40).

Adicional a la neutralización del virus, la respuesta de anticuerpos al HVB-1 puede ayudar en la recuperación de la infección por otros mecanismos los cuales incluyen:

a) servir de intermediarios para la lisis de células infectadas por la vía del complemento, antes de que se dé la diseminación viral de célula a célula;

b) la ADCC en la cual la IgG interactúa con células positivas a receptores Fc tales como los neutrófilos y los macrófagos; y

c) ADCC mediada por complemento en la cual el componente C3b se une a la IgM y éste se une a su vez, a los receptores CR1 específicos, presentes en linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Adicional a todas las anteriores funciones, también se ha observado que los anticuerpos contra el HVB-1 bloquean los efectos

inmunosupresores inducidos por el HVB-1 sobre las células T; esto demuestra una vez más la importancia de la respuesta inmune cooperativa contra este patógeno (10).

La respuesta inmune humoral o de mucosas se basa en la producción de anticuerpos neutralizantes, los cuales pueden ser detectados a los 8-12 días posinfección y requieren una reestimulación ocasional para su persistencia. Se han registrado títulos de anticuerpos neutralizantes (SN) tan altos como 1:256 en caso de infección natural, pero el límite usual varía de 1:8 a 1:64, y se ha sugerido un papel protector de la infección inicial mediante los anticuerpos (IgA) secretorios locales en las formas genital y respiratoria de la enfermedad (6,30).

Los títulos de anticuerpos maternos pueden persistir hasta por 4 meses. En terneros jóvenes que sufren la enfermedad multisistémica, la susceptibilidad es atribuida a defectos tanto en la función leucocitaria como en la respuesta inflamatoria, ya que se ha observado, que los leucocitos del neonato tienen deficiencias funcionales en la capacidad para migrar hacia microorganismos, fagocitarlos y matarlos (34).

Así mismo, se ha demostrado que después de la transferencia pasiva de anticuerpos (calostro o anticuerpos monoclonales) altos títulos neutralizantes no son suficientes para impedir la infección aunque si previenen la muerte (10).

Inmunosupresión inducida por el HVB-1

Varios estudios in vitro han demostrado que este virus tiene efectos inmunosupresores sobre la función leucocitaria. Las alteraciones in vivo en relación con cambios en la movilidad leucocitaria también son evidencias de alteración en la integridad del sistema inmune del hospedero. Los mecanismos inmunosupresores se consideran importantes para la inducción de infecciones bacterianas secundarias (tales como la pasterelosis neumónica), aunque el proceso inflamatorio inducido por el virus "*per se*" también puede crear condiciones ambientales que favorecen el crecimiento bacteriano (10).

Entre los diferentes efectos inmunosupresores caracterizados in vitro se cuentan: 1) la capacidad del

HVB-1 inactivado con L.V. para inhibir la respuesta proliferativa de los mononucleares de sangre periférica (MNSP) a la IL-2 ó a un antígeno, con factores supresores que pueden ser demostrados en sobrenadantes libres del virus 2) la lisis de linfocitos T activados cuando son infectados con el HVB-1 (19) 3) deterioro en las funciones de los macrófagos alveolares en cuanto a su participación en la ADCC y reducción en la liberación de TNF- α cuando son estimulados con inductores de endotoxinas (15).

Factores inmunes, probablemente anticuerpos específicos del virus o complejos inmunes, parecen responsables por un efecto inhibitorio directo del virus sobre la función de los macrófagos alveolares. Sin embargo tampoco ha sido excluida la posibilidad de que se inserten antígenos virales en la membrana de macrófagos alveolares infectados, los cuales podrían destruir la señalización transmembrana (1) estudios in vivo han demostrado que la infección con el HVB-1 también podrían producir un retardo en la infiltración neutrofílica del pulmón infectado con bacterias. Neutrófilos obtenidos de bovinos experimentalmente infectados parecen paralizados in vitro, mostrando poca migración o respuesta a los estímulos quimiotácticos.

El entendimiento de cómo el virus induce toda una red de inmunosupresión es importante en el diseño de vacunas para prevenir la infección viral y reactivación de infecciones persistentes (43).

Respuesta inmune durante la latencia

Aunque se tiene mucha información respecto a la respuesta inmune durante la infección, se sabe muy poco acerca de los factores inmunológicos que interactúan durante el establecimiento y el mantenimiento de la latencia. De acuerdo con una hipótesis, algunas formas de vigilancia inmune pueden jugar un papel importante en el mantenimiento del virus en el estado latente.

De hecho la reactivación es inducida por una serie de estímulos, todos asociados con una alteración de la respuesta inmune tales como condiciones de estrés o tratamiento con glucocorticoides (36).

Existe por ejemplo, evidencia tanto in vitro como in vivo de que los corticoides alteran las funciones de PMN

y linfocitos, lo que condujo al concepto de que estas poblaciones celulares podían estar involucradas en el mantenimiento de la latencia. Sin embargo los corticoides también pueden tener un efecto directo sobre las células latentemente infectadas, esta última hipótesis que no involucra la respuesta inmune parece ser más probable (8).

Se ha postulado que la dexametasona reprime el promotor de los transcritos relacionados con latencia (LR), los cuales se ha propuesto que, podrían estar regulando la expresión de genes IE de la replicación en células bovinas infectadas; lo anterior podría sugerir un papel directo de la dexametasona en la reactivación del HVB-1. Sin embargo, aunque la respuesta inmune no jugara un papel importante en el mantenimiento de la latencia se conoce su importancia cuando la reactivación ocurre (40).

Teóricamente para lograr un control óptimo del virus reactivado el reconocimiento inmune de las células infectadas debería ocurrir antes del ensamblaje de nuevos viriones, por lo tanto, varios mecanismos citotóxicos incluyendo CTL o CCDA se espera que sean efectivos si ellos son específicos para proteínas que sean sintetizadas antes de la replicación del DNA viral (tales como gpI o gp IV) (10).

2. Vacunas

Hasta hace pocos años solo existían en el mundo tres tipos de vacunas contra la RIB:

- Vacuna inactivada: generalmente se encuentra combinada con la PI3 y la pasterelosis y se recomienda vacunación anual. Además de no inducir abortos, ni reacciones postvacunales, se elimina el riesgo de diseminación de virus patógenos vacunales y de crear infecciones latentes con el mismo virus vacunal.

No obstante debido a la necesidad de revacunar frecuentemente para mantener una respuesta inmune apropiada, los programas de prevención resultan insostenibles (1,6).

- Vacuna a base de virus vivo modificado, para uso intramuscular: posee las siguientes ventajas: fácil

aplicación, se consigue asociada con virus de la diarrea viral bovina (DVB), Parainfluenza3 (PI3) y Pasteurella y confiere inmunidad duradera similar a la inducida por la infección natural. Sin embargo, tiene la desventaja de no poderse utilizar en hembras gestantes debido a que puede inducir abortos (13,30).

- Vacuna a base de virus vivo modificado para uso intranasal: la cual confiere una rápida protección atribuida a la producción de interferón y a la inducción de anticuerpos tipo IgA en la mucosa. Su desventaja radica en la mayor dificultad de aplicación y en las reacciones postvacunales ocasionales tales como: fiebre, descarga nasal y descenso en la producción láctea (33,43)

Las vacunas vivas modificadas en general, tienen como ventaja el que inducen buena inmunidad después de una sola dosis y son fáciles de producir, sin embargo pueden presentar alguna virulencia residual y persistencia en el huésped. Al igual que las vacunas de virus inactivado, tampoco previenen la infección y subsecuente latencia del virus tipo silvestre. No permiten la diferenciación serológica entre bovinos vacunados e infectados, ciertos antígenos en las vacunas virales completas son inmunosupresores, es decir pueden inducir la disminución de la respuesta de anticuerpos contra otros antígenos en el hospedero, lo que puede resultar en interferencia con la inducción de respuesta inmune a vacunas coadministradas. Debido a que las prácticas modernas de manipulación incluyen inmunización simultánea de animales con vacunas múltiples, la respuesta inmune a la vacuna puede no ser ideal si el HVB-1 vivo modificado es uno de los componentes de la vacuna (16).

Debido a todos los inconvenientes planteados para las vacunas existentes, se ha buscado insistentemente una vacuna alternativa. Tres de las glicoproteínas de envoltura del HVB-1: gpI, gpIII y gpIV son componentes críticos para la inducción de la respuesta inmune protectora humoral y celular. Algunos experimentos in vitro han indicado que anticuerpos monoclonales

específicos contra gpI, III y IV inhiben la adherencia y la penetración del virus a las células hospederas (11).

Con base en la tecnología del DNA recombinante, trabajos previos con el HVB-1 y otros herpesvirus han sugerido que las proteínas análogas pueden ser candidatos prometedores de vacunas subunitarias eficientes y seguras. El uso de las glicoproteínas como vacunas subunitarias evitaría la infección latente, el aborto y la inmunosupresión inducida por las vacunas con virus completos (43). Basados en los anteriores fundamentos se han propuesto varios ensayos entre los cuales se pueden destacar los siguientes:

- Un estudio reciente planteó que para la verdadera protección de la infección por el HVB-1 era necesaria la generación de una respuesta inmune local, en el sitio de entrada del agente infeccioso (mucosa nasal); los anticuerpos allí producidos cubrirían e inactivarían los viriones antes de que ellos tuvieran la oportunidad de infectar las células. Esta respuesta humoral puede ser inducida por la administración de la gp I de la envoltura del HVB-1, cuyo gen codificante se inserta en el genoma del papilomavirus bovino, el cual es usado como vector y puesto a crecer en cultivos de fibroblastos bovinos los cuales reproducen la proteína que mas tarde es purificada y aplicada en compañía de un adyuvante (incompleto de Freund).

Aunque los animales vacunados experimentalmente fueron retados con dosis inferiores a las empleadas en investigaciones previas, dicha preparación logra niveles deseables de protección; sin embargo, la vacuna aún no ha sido probada bajo condiciones de campo, ni se ha establecido el tiempo de duración de la inmunidad concedida por ésta (21).

- Basado igualmente en el papel clave que juega la inmunidad de las mucosas a través de la IgG1 y la IgA presentes en las secreciones nasales, que es prevenir la penetración y el establecimiento inicial de los patógenos virales, se ha venido trabajando en la elaboración de una vacuna con base en la gpI

truncada, es decir sin su dominio transmembránico. Esta proteína secretada al medio extracelular y posteriormente purificada de él parece suficiente para inducir la inmunidad nasal y superar los obstáculos de las vacunas presentes para el HVB-1 (16).

- Otro acercamiento adicional se realizó con base en la producción de la gp IV de envoltura, obtenida por infección de células de insecto con un baculovirus (virus que infecta insectos) recombinante. Aunque su respuesta fue apropiada in vitro, serán necesarias pruebas posteriores, ya que, como se sabe, las proteínas producidas por este medio pueden presentar problemas de reconocimiento in vivo, debido a una falta de glicosilación y a una conformación tridimensional inadecuada (42).
- En el mismo sentido han sido empleadas otros vectores de expresión para la gp IV, tales como la *E. coli* y los virus adeno y vaccinia recombinantes y aunque todos son promisorios aún se encuentran en fase de experimentación (40).
- El gen codificante de la misma gp IV, pero en una versión truncada ha sido transfectado a células de mamífero en cultivo (MDBK), bajo la regulación del promotor del gen que codifica para la proteína del shock térmico de 70 kd en bovinos. De esta forma se ha obtenido un sistema de producción de proteína recombinante que puede ser reutilizado; a diferencia de los métodos antes mencionados donde las células infectadas eran destruidas. Posteriormente la proteína secretada al medio extracelular fué usada como vacuna en forma cruda o purificada y estimuló la producción de anticuerpos tipo Ig A protectores de la infección primaria, en terneros inmunizados y luego desafiados experimentalmente (44).
- Así mismo, se han realizado otros estudios utilizando como alternativa, la producción de anticuerpos anti-idiotípicos, que hasta ahora han demostrado tener éxito en ratones y en ensayos preliminares con terneros, los cuales han sido desafiados con la gp

IV del HVB-1. En este trabajo falta determinar la efectividad de la vacuna en pruebas de campo (39).

- Otros investigadores sugieren que para erradicar el HVB-1 en un país con una alta prevalencia de infección, sería importante desarrollar una vacuna que contenga un marcador. Con esta idea se ha propuesto el estudio de una cepa del HVB-1 deficiente en el gen E, no induce anticuerpos anti gp E en bovinos vacunados y permite la diferenciación serológica de animales vacunados e infectados usando una prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra la glicoproteína E (22).

Adicionalmente, el virus mutado presenta una reducción marcada de su virulencia y capacidad de diseminación después de inducir su reactivación con corticosteroides. Esta podría ser una buena candidata de una vacuna eficaz y segura, aunque aún se encuentra en fase experimental (45).

Un alcance aún mayor de las vacunas basadas en la tecnología del DNA recombinante, lo constituye el acompañamiento del virus vector o de la proteína sintética, con citoquinas moduladoras de la respuesta inmune tipo IL-1 ó TNF- α . También se ha propuesto la inserción del gen codificante de dichas citoquinas en el genoma vectorial para inducir una respuesta mucosal efectiva por medio del "suicheo" de las Igs hacia el isotipo A controlando de esta forma la infección primaria. Una aplicación reciente de esta propuesta es el uso de la gI del HVB-1 unida a la IL-1 β recombinante que ha demostrado estimular la producción de Ig A específica para proteger de la infección con cepas silvestres del HVB-1 (11)

Finalmente, dado que la glicoproteína IV ha sido ensayada y ha demostrado ser un excelente inmunógeno no solo para prevenir la enfermedad clínica sino también la diseminación del virus de animales que son desafiados con el virus virulento, parece ser la mejor candidata para el desarrollo de la vacuna subunitaria (43).

Ya han sido adelantados muchos estudios con este propósito, pero antes de poder usar en forma comercial cualquiera de las opciones antes mencionadas, es necesario buscar el adyuvante más apropiado con el cual pueda ser combinada. Estos adyuvantes serán importantes para asegurar que la magnitud, la cinética y la duración de la respuesta inmune sean suficientes para prevenir la infección (40).

El desarrollo de adyuvantes novedosos (citoquinas, ISCOMS, etc) y vehículos de liberación lenta (microportadores), combinados con sistemas de expresión de alto nivel para producir grandes cantidades de gpIV, darán las bases para que las vacunas contra el HVB-1 sean en un futuro, no solo mejores sino, más seguras (43).

De otro lado, recientemente se ha demostrado que la transferencia de genes funcionales puede llevarse a cabo mediante la introducción de plásmidos inicialmente diseñados para la transfección de células de mamíferos en cultivo dentro de tejidos de animales vivos (47). Los plásmidos ni se integran ni se replican dentro de la célula blanco pero en cambio son eficientemente transcritos y traducidos. Estos plásmidos que portan genes funcionales, han sido introducidos en tejidos vivos como DNA desnudo, encapsidados en liposomas y como DNA asociado a lípidos poliiónicos o glicoproteínas (7).

Algunos investigadores han demostrado que tal tecnología tiene aplicación para inducir respuesta inmune contra la gp IV en bovinos (16,17,47). Una posible ventaja de esta aproximación es que los animales podrían ser vacunados tempranamente en la vida, cuando ellos aún tienen anticuerpos maternos asegurando por lo tanto que ellos están adecuadamente protegidos contra la infección con el HVB-1 después de la caída de los anticuerpos maternos. Si esto fuera posible se podría alterar dramáticamente la economía de la vacunación y la producción de vacunas, así como permitir la inmunización bajo varias condiciones de manejo (43).

HVB-1 como vector

El HVB-1 presenta varias propiedades que hacen de él un candidato ideal para servir como vector vacunal para genes de otros patógenos bovinos (3).

1. Infecta bovinos y un estrecho rango de otros animales y más importante aún, no infecta al hombre; por lo cual, su uso como vector en contraste con el virus de la vaccinia, podría involucrar pocas consideraciones de salud pública (23).
2. Las cepas de vacuna viva atenuada del HVB-1 ya existen y han sido usadas por muchos años en vacunas para bovinos (3,43).
3. Existe el precedente de otros alfa herpesvirus usados como vectores. Tales como el virus de la Pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky (41).

Ahora el uso del HVB-1 como vector de vacunas, sólo tendría dos requerimientos mínimos:

1. Contar con un sitio no esencial en su genoma dentro del cual se puedan insertar genes extraños (3).
2. Tener un promotor que pueda ser usado para dirigir la transcripción de los genes extraños (3).

En el HVB-1, el sitio no esencial podría ser el que ocupa el gen de la timidina kinasa (tk), el cual ya ha sido mapeado y secuenciado en varios laboratorios (30,46).

Adicionalmente algunos investigadores han mapeado y secuenciado el gen para la glicoproteína denominada gpI de la envoltura del HVB-1, cuyo promotor podría ser el indicado para dirigir la transcripción (3).

Una aplicación del anterior argumento, fue diseñada

utilizando el virus de la RIB como vector genéticamente manipulado. Un mutante atenuado por medio de una delección\inserción en el gen de la tk, fué capaz de servir como vacuna de virus vivo modificado para la protección de bovinos contra la RIB y al mismo tiempo de amplificar la expresión in vivo de epítopes del virus de la fiebre aftosa (24).

En otra aplicación posterior del mismo principio, se insertó el gen que codifica para la gpIII del virus de la enfermedad de Aujeszky (herpesvirus porcino-1) en el HVB-1 atenuado por delección\inserción en el gen de la tk. El gen en el virus recombinante se expresó eficientemente lo cual demostró que las proteínas reguladoras de la transcripción inmediata temprana del HVB-1 fueron competentes para transactivar el gen tardío de la gpIII del virus de la enfermedad de Aujeszky (25).

Durante experimentos in vitro llevados a cabo con ambas vacunas, se observaron buenas respuestas inmunes contra los virus cuyo material había sido insertado (24,25).

Por último, existe la posibilidad de usar el HVB-1 como vector que exprese genes de virus bovinos que hagan parte del complejo respiratorio denominado "fiebre de embarque" incluido el HVB-1. Vale la pena anotar que el HVB-1 guarda gran similitud con los Herpes Simplex humanos, los cuales pueden ser manipulados por ingeniería genética y albergar de acuerdo con algunas estimaciones, hasta 24 Kpb de información extraña en su genoma; de acuerdo con esto el HVB-1 podría recibir gran cantidad de DNA extraño requerido para formar la vacuna multivalente respiratoria bovina (36).

Actualmente se adelantan experimentos para estudiar la expresión de genes de los virus Respiratorio Sincitial (VRS), de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y de la Para Influenza Bovina 3 (PI3) (3).

Summary

Immune response and vaccines against the Infectious Bovine Rhinotracheitis. BHV-1 is an immunosuppressor agent which is implicated in "shipping fever syndrome" and is associated with a decrease antibacterial activities of macrophages and polymorphonuclears neutrophils. As well as for its ability to produce lysis of activated T lymphocytes.

Since the 60's vaccines have been used against IBR, however it has not been possible to design an effective and safe product. Nowadays, some molecular technics such as clonation and genetic expression systems have permit the development of new alternatives for immunization against IBR.

This article reviews the most relevant aspects of specific and non especific response against BHV-1, the mechanisms of immunosupression and the expected goals in the development of new vaccines.

Referencias

1. ARBOLEDA J, BEDOYA D, RODAS J. Estudio sobre la Rinotraqueitis Infecciosa bovina en un hato lechero del Valle del Aburrá. Trabajo de Grado. Fac de Med Vet y de Zoot- Univ. de Antioquia, 1991.
2. BABIUK LA. et al. Effect of bovine a 1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. J Gen Virol. 1985, No. 66:2383
3. BELLO L, WHITBECK J, LAWRENCE W. Bovine herpesvirus 1 as a live virus vector for expresion of foreign genes. Virol. 1992; 190: 666-673.
4. BIELEFELDT OH, BABIUK LA. Alteration of alveolar macrophage functions after aerosol infection with bovine herpesvirus type 1. Infect Immun. 1986; No. 51: 344.
5. BIELEFELDT OH. et al. A neutrophil-derived antiviral protein: induction requeriments and biologicals properties. J Virol. 1989, No. 63:1916.
6. BLOOD D, HENDERSON J, RADOSTITS O. Medicina Veterinaria. 5 ed. México: Interamericana, 1982. 1191 p.
7. COX GJ, ZAMB TJ, BABIUK LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. J Virol. 1993, Vol 67 No.9:5664-5667.
8. DAVIES D, CARMICHAEL L. Role of Cell-Mediated Immunity in the Recovery of Cattle from Primary and Recurrent Infections with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. Infec Immunol. 1973; Vol 8 No.4: 510-518.
9. DENNIS M. et al. Identification of different target glycoproteins for bovine herpesvirus-1-specific cytotoxic t lymphocytes depending of the method of in vitro stimulation. Immunol. 1993,78:7.
10. DENNIS M. et al. Infectious Bovine Rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus 1) Helper T cells, cytotoxic T cells and NK cells. En : Cell - mediated immunity in ruminants. Bélgica. CRC Press. 1994. p.p. 157-172
11. DUBUISSON J, ISRAEL B, LECTCHWORTH III G. Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glicoproteins gI, gIII and gIV. J Gen Virol 1992; 73: 2031-2039.
12. ELLIS J A,HASSARD L E and CORTESE V. Stimulation of bovine herpesvirus 1 specific T lymphocyte and antibody responses in cattle following immunization with a polyvalent vaccine. Agri-Practice 1994;15:9.
13. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. Veterinary Virology. Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
14. FITZGERALD-BOCARSLY P. et al. Immediate-early gene expression is sufficient for induction of natural killer cell-mediated lysis of herpes simplex virus type 1-infected fibroblasts. J Virol. 1991, 65:3151.
15. FORMAN AJ, BABIUK LA. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bovine alveolar macrophage function. Infect Immunol. 1982, 35:1041.
16. GAO Y, LEARY T, ESKRA L, SPLITTER G. Truncated bovine herpesvirus-1 glycoprotein I (gpI) initiates reponse in its natural host. Vaccine 1994; Vol 12 No.2: 145-152.
17. GAO Y, DALEI MJ, SPLITTER GA. BHV-1 glicoprotein 1 and recombinant interleukin 1-beta efficiently elicit mucosal IgA response. Vaccine 1995; 13:871-877.
18. GREWAL AS, ROUSE BT, BABIUK LA. Mechanisms of resistance to herpevirus: comparison of the effectiveness of different cell types in mediating antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. Infect Immun. 1977, No.15:698
19. GRIEBEL P J, OHMANN H B,LAWMAN M J P, et al. The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T limphocytes. J of Gen Virol. 1990,71:369-377.
20. HERCEND T, SCHMIDT RE. Characteristics and uses of natural killer cells. Immunol Today. 1988; 9:291.
21. ISRAEL B, HERBER R, GAO Y, LETCHWORTH III J. Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus 1 replication in cattle. Virol 1992; 188: 256-264.
22. KAASHOEK M, MOERMAN A, MADIC J, et al. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine 1994; Vol 12 No.5: 439-444.

23. KAHRS R. IBR: A review and update. *J Am Vet Med Ass* 1977; Vol 176 No.4: 1055 - 1064.
24. KIT M, KIT S, LITTLE S. et al. Bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)-based viral vector which expresses foot-and-mouth disease epitopes. *Vaccine* 1991; 9: 564-572.
25. KIT S, OTSUKA H, KIT M. Expression of porcine pseudorabies virus genes by a bovine herpesvirus-1 (infectious bovine rhinotracheitis virus) vector. *Arch virol* 1992; 124: 1-20.
26. KUZUSHIMAK. et al. Inhibitory effect of herpes simplex virus infection to target cells on recognition of minor histocompatibility antigens by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1990; 144:4536.
27. LEARY TP, SPLITTER GA. Recombinant herpesviral proteins produced by cell-free translation provide a novel approach for the mapping of T lymphocyte epitopes. *J Immunol.* 1990; 145:718
28. LJUNGGREN HG, KARRE K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237.
29. LOPEZ-GUERRERO JA, ALARCON B, FRESNO M. Mechanism of recognition of herpes simplex virus type 1-infected cells by natural killer cells. *J Gen Virol.* 1988; 69: 2859.
30. MERCHANT I, PACKER R. *Bacteriología y virología Veterinarias.* 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1980; 763p.
31. MILLER J, WHESTONE C, BELLO L. et al. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1038-1043.
32. MOHANTY S, DUTTA S. *Virología Veterinaria.* México: Interamericana, 1983. 412p.
33. NEIRA R. Rinotraqueitis Infecciosa bovina. *Revista Acovez.* 1986; Vol 10 No.34: 23-26.
34. OHMANN H, BABIUK L, HARLAND R. Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the pathogenesis of respiratory tract infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 60: 153-170.
35. PALMER LD. et al. Bovine natural killer-like cell responses against cell lines expressing recombinant bovine herpesvirus type 1 glycoproteins. *J Immunol.* 1990; 145:1009.
36. ROCK D. Characterization of Dexamethasone-Induced Reactivation of Latent Bovine Herpesvirus-1. *J Virol.* Apr 1992; 2484-2490.
37. ROIZMAN B, JENKINS FJ. Genetic engineering of novel genomes of large DNA viruses. *Science* 1985, 229:1208-1214.
38. ROUSE BT, BABIUK LA, HENSON PM. Neutrophils in antiviral immunity: inhibition of virus replication by a mediator produced by bovine neutrophils. *J Infect Dis.* 1980; 141: 223-239. SRIKUMARAN S, ONISK D, BORCA M. et al. Anti-idiotypic antibodies induce neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1. *Immunol* 1990; 70: 284-289.
40. TIKOO SK, CAMPOS M, BABIUK LA. Bovine Herpesvirus-1: Biology, pathogenesis and control. *Adv Virus Res.* 1995; 45:191-223.
41. THOMPSEN DR. et al. Pseudorabies virus as a live virus vector for expression of foreign genes. *Gene* 1987; 57:261-265.
42. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, PARKER M, FITZPATRICK D. et al. Expression of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV by recombinant baculovirus and analysis of its immunogenic properties. *J Virol* 1991; Vol 65 No.1: 263-271.
43. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO S, LIANG X, BABIUK L. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Imm. and Cell Biol* 1993; 71: 405-420.
44. VAN DRUNEN LITTEL - VAN DEN HURK S. et al. A subunit gIV vaccine produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus - 1 in cattle. 1994; *Vaccine* Vol 12 No.14: 1295-1302.
45. VAN ENGELBURG FA, KAASHOEK MJ, VAN OIRSCHOT JT. et al. A glucoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus-1 infects the same limited number tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J Gen Virol.* 1995; 76:2387-2392.
46. WHESTONE C, MILLER J, SEAL B. et al. Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol* 1992; 122: 207-214.
47. WOLFF JA. et al. Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:363-369.