

## Tesis de Posgrado

# Efectos de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune a vacunas antiaftosa

Berinstein, Analía

1992

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Berinstein, Analía. (1992). Efectos de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune a vacunas antiaftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2467\\_Berinstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2467_Berinstein.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Berinstein, Analía. "Efectos de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune a vacunas antiaftosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2467\\_Berinstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2467_Berinstein.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**EFFECTO DE DIFERENTES INMUNOMODULADORES EN LA RESPUESTA  
INMUNE A VACUNAS ANTIAFTOSA**

ANALIA BERINSTEIN

Director de Tesis: Dra. ANA MARIA SADIR

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE VIROLOGIA, CENTRO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS VETERINARIAS, INTA, CASTELAR

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

1992

*Tesis  
2467  
ej. 2*

**A mis padres, Susana y Elías**

**A mis hermanos, Judith, Leonardo y Laura**

**A mis abuelos, Luisa y José**

**A la memoria de mis abuelos, Sarita y Mauro**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres por haberme alentado incondicionalmente en este proyecto y por haber permitido, de alguna forma, que se concretara.**

**A mis hermanos por haber estado a mi lado en todo momento.**

**A la Dra. Ana María Sadir por su dirección y apoyo que permitieron la realización de este trabajo.**

**Al Dr. Alejandro A. Schudel quien siempre ha estado a disposición.**

**Al Dr. Manuel Borca por su valiosa revisión crítica del manuscrito.**

**A Antonio Varone por su constante compañía y excelente ayuda técnica.**

**Al personal del Instituto de Virología, CICV, INTA, Castelar, sin cuya colaboración no se hubiera podido realizar este trabajo y, especialmente, a Ana María Hernández y Carmen Maciel.**

**A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Patricia Piatti y Eliana Smitsaart, por el apoyo que me brindaron y por los buenos momentos compartidos.**

**A Fabiana, Claudia y Mariana por su permanente entusiasmo e incondicionalidad, a Alejandra por su constante compartir a lo largo de estos años de "becarias", a Daniela y Carolina por su paciencia y estímulo.**

**A Alejandro por haber estado siempre.**

## INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. Virus de la Fiebre Aftosa .....	1
I.1.1. Características generales de los picornavirus.....	1
I.1.2. Características morfológicas del VFA.....	2
I.1.3. Ciclo biosintético del VFA.....	4
I.1.4. Características antigénicas e inmunogénicas del VFA.....	6
I.1.5. Respuesta inmune de ratones al VFA.....	7
I.2. Fiebre Aftosa.....	8
I.2.1. La enfermedad producida por el VFA.....	8
I.2.2. Distribución geográfica del VFA y medidas de control.....	10
I.3. Vacunas contra el VFA.....	11
I.3.1. Vacunas en uso.....	12
I.3.2. Vacunas experimentales.....	14
I.3.2.1. Vacunas formuladas con adyuvantes.....	14
I.3.2.2. Vacunas biosintéticas.....	16
I.3.2.3. Vacunas a péptidos sintéticos.....	17
I.4. Adyuvantes.....	18
I.4.1. Modos de acción.....	19
I.4.1.1. Acción de los adyuvantes sobre el Ag.....	19
I.4.1.2. Acción de los adyuvantes sobre el hospedador.....	20
I.4.2. Efectos indeseados de los adyuvantes.....	22
I.4.3. Adyuvantes utilizados en este trabajo.....	23
II. OBJETIVO.....	26
III. MATERIALES Y METODOS.....	28
III.1. Ratones.....	28

	Pág.
III.2. Virus.....	28
III.3. Obtención de virus.....	28
III.4. Inactivación de virus.....	29
III.5. Purificación de virus.....	29
III.6. Adyuvantes utilizados.....	30
III.7. Formulación de las diferentes vacunas.....	30
III.8. Extracción de sangre; obtención de plasma.....	32
III.9. Titulaciones.....	32
III.10. Duración de inmunidad.....	32
III.11. Desafío viral.....	33
III.12. Obtención de Acs anti-Thy.....	33
III.13. Caracterización de poblaciones celulares.....	33
III.14. Preparación de suspensiones celulares.....	34
III.15. Inmunodepresión.....	35
III.16. Reconstitución de animales irradiados.....	35
III.17. Test de ELISA.....	35
IV. RESULTADOS.....	37
IV.1. Determinación de la DMI.....	37
IV.2. Determinación de la duración de inmunidad luego de la vacunación con diferentes formulaciones en ratones Balb/c.....	39
IV.2.1. Duración de inmunidad frente a vacunas convencionales.....	39
IV.2.2. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con avridine.....	41
IV.2.3. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con PCM.....	43
IV.2.4. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con LPS.....	45
IV.3. Resistencia al desafío viral.....	47

	Pág.
IV.4. Estudio de la respuesta secundaria de larga duración inducida por las diferentes formulaciones.....	49
IV.5. Determinación de la duración de inmunidad luego de la vacunación con diferentes formulaciones en ratones NIH <i>nu/nu</i> y <i>nu/+</i> .....	55
IV.6. Estudio de la cooperación entre linfocitos T y B.....	60
IV.7. Determinación de isotipos de IgG inducidos por las diferentes formulaciones.....	63
V. DISCUSION.....	68
VI. CONCLUSIONES.....	75
VII. RESUMEN.....	76
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	78



## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
ACF	Adyuvante Completo de Freund
Ag	Antígeno
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
AM	Anticuerpos monoclonales
AN	Anticuerpos neutralizantes
BB	Buffer de bloqueo
BEI	Bromuro de etilenimina
BHK-21	Línea celular de riñón de hamster bebé
BSA	Seroalbúmina bovina
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
DIRL50%	Dosis infectante ratón lactante 50%
DMI	Dosis mínima inmunizante
d.p.i.	Días post-inoculación
d.p.v.	Días post-vacunación
FA	Fiebre aftosa
FC'50%	Fijación de complemento 50%
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
ISN	Índice seroneutralizante
KLH	Keyhole limpet haemocyanin

LPS	Lipopolisacárido
MDP	Muramildipeptido
MOI	Multiplicidad de infección
PAA	PBS, BSA, azida albúmina
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	PBS, Tween 20
PCM	Extracto de pared celular de Mycobacteria
p. r.	Post-reconstitución
p. v.	Post-vacunación
r. p. m.	Revoluciones por minuto
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VIP	VFA inactivado y purificado

## **I. INTRODUCCION**

### **I.1. Virus de la fiebre aftosa**

El virus de la fiebre aftosa (VFA), único miembro del género aphtovirus dentro de la familia Picornaviridae, es el agente causal de una de las enfermedades virales más devastadoras de las especies domésticas productoras de alimentos, debido a su amplia distribución y extrema contagiosidad (16, 159).

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 (16).

#### **I.1.1. Características generales de los Picornavirus**

La familia Picornaviridae incluye a virus con genoma ARN (+) infeccioso de cadena simple, pequeños, poliédricos y sin envoltura, que se caracterizan por ser importantes patógenos para el hombre y numerosos animales de interés ganadero.

Esta familia de virus es usualmente dividida en 4 géneros y un grupo no clasificado (50, 114):

.- enterovirus: poliomieltis, hepatitis A, cocksakie, echovirus en humanos, enterovirus en animales y poliovirus en ratón.

.- rinovirus: rinovirus humanos y bovinos.

.- cardiovirus: mengovirus y el virus de la encefalomiocarditis.

.- aphtovirus: virus de la fiebre aftosa.

.- no clasificados: rinovirus equino y virus de insectos.

Estos grupos se diferencian por sus propiedades fisicoquímicas y serológicas, como también por 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 antígenos (Ags) de superficie (50, 157).

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 (1).

2.- Genoma consistente de una única molécula de ARN (+) infeccioso tanto "in vivo" como "in vitro" (3, 48).

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 (93, 102).

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 (93, 161).

### **I.1.2. Características morfológicas del VFA**

El VFA consiste de una cápside desnuda de 30 nm de diámetro. Tiene un peso molecular de aproximadamente  $7 \times 10^6$  daltons y contiene un genoma de cerca de 8500 nucleótidos (16). Su composición química es de un 30% ARN y un 69% proteínas (152).

La cápside viral está compuesta por 60 copias de cada una de 4 proteínas designadas VP1, VP2, VP3 y VP4 (50) producidas por clivaje post-traducciona l de un precursor común (158). La estructura tridimensional del VFA ha sido determinada recientemente por cristalografía de rayos X y, en común con otros picornavirus, se observa claramente que las características superficiales del virus están dadas por residuos de aminoácidos (aa) de VP1, VP2 y VP3 mientras que la proteína VP4 es completamente interna (1). VP1, VP2 y VP3 tienen una masa molecular de aproximadamente 24000 daltons mientras que la de VP4 es de 7000 daltons (29). El virión posee una simetría icosaédrica 5:3:2. A su vez, cada cara del icosaedro está formada por 5 trímeros de VP1, VP2 y VP3 (170, 171). La partícula viral contiene también 1 ó 2 copias de la proteína precursora VP0 no clivada (176).

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146 Svedbergs (partícula 146S). La partícula 146S es fácilmente dissociable, por tratamiento a  $\text{pH} < 7$ , en subunidades virales 12S (153), que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a VP4 (39).

Existe, además, otro tipo de partícula viral luego de la infección con un coeficiente de sedimentación de 75S que corresponde a la cápside vacía. Es un producto naturalmente defectivo que contiene VP1, VP3 y VP0 pero no contiene ARN (176).

El tratamiento con tripsina de virus tipo A u O purificados resulta en el clivaje de VP1 con una consecuente pérdida de infectividad, de inmunogenicidad (184) y de la habilidad del virus de interactuar con su receptor celular en la célula intacta (24). Estos datos indicarían que VP1 es la proteína que posee los determinantes antigénicos principales del VFA así como la proteína involucrada en el reconocimiento del receptor en la célula blanco (79).

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' (16, 157). 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 (64).

### I.1.3. Ciclo biosintético del VFA

El ciclo infectivo del VFA es un proceso rápido que culmina en aproximadamente 2 horas y media. La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción, proceso reversible cuya etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, siendo requerida la presencia de cationes bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) sin los cuales el fenómeno no ocurre (34). La replicación y el ensamblado ocurren en el citoplasma de la célula hospedadora y el virus es liberado por lisis celular (153).

Existen pocos reportes de aislamiento o identificación de receptores. En cultivos de células de riñón de cerdo se encontraron entre 30 y 100 receptores por célula (34). 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 (23). Los mismos autores indicaron que los virus tipo A, O y C pueden utilizar al menos algunos receptores comunes.

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 adsorbido a su superficie (34). 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 subunidades proteicas 12S, dejando el ARN genómico libre para iniciar su replicación (43, 44).

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 (12).

El evento traduccional da lugar a 4 productos primarios en dirección 5'-3': i) la poliproteína P88 (precursora de todas las proteínas estructurales del virus); ii) la proteína P52 (que es posteriormente clivada para dar la proteína P100 quien a su vez es precursora de VPg); iii) una proteasa y iv) la enzima ARN polimerasa ARN dependiente (93).

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 (139).

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 (77). La formación del virión maduro de 146S involucra el clivaje de casi la totalidad de cadenas VP0 para dar VP2 y VP4, lo que conlleva al reordenamiento de la cápside viral y constituye el último paso de la maduración viral (152).

En células de riñón bovino infectadas con alta multiplicidad de infección (MOI), la fase de eclipse dura de 100 a 110 minutos (143), 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 (152), existe cierta evidencia de una liberación prelitica del virus a través de vesículas citoplasmáticas que emergen de células infectadas (188).

#### **I.1.4. Características antigénicas e inmunogénicas 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 VFA purificado: i) viriones 146S y ii) subunidades 12S. Sólo los anticuerpos (Acs) anti-146S son tipo específicos ya que las partículas 12S reaccionan con antisueros heterotípicos (36). Algunos epitopes son compartidos por ambas partículas ya que la actividad anti-146S de un suero se ve disminuída cuando éste es adsorbido previamente con partículas 12S (54).

La primer idea de que sólo la partícula 146S induce la producción de anticuerpos neutralizantes (AN) (35) fue desafiada por el hecho de que cerdos y bovinos inmunizados con subunidades proteicas 12S emulsificadas en adyuvante oleoso resistían la infección con el virus homólogo (128).

El primer esfuerzo de identificación de epitopes inmunodominantes en partículas del VFA fue la demostración de que el tratamiento enzimático del virus altera su reactividad antigénica (21). 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 Ac anti-virus en cobayos que el virus sin tratamiento. Asimismo una mezcla aislada de fragmentos de VP1 en cobayos indujo una fuerte respuesta de AN demostrando la existencia de un epítoto tripsina resistente funcional en estado intacto (17). Estos datos preliminares sostienen que VP1 tiene un predominante rol inmunogénico y por otra parte que posee varios epitopes protectivos. Entonces VP1 sería la única de las 4 proteínas estructurales del virus capaz de inducir la producción de AN y protectores al ser administrada en forma purificada en animales (122, 137).

Los epitopes virales lineales se han localizados en la mitad carboxiterminal de VP1, ya que fragmentos de esta zona obtenidos por diferentes métodos (clivaje con agentes químicos, péptidos sintéticos) también inducen AN (66, 140).



En particular se ha identificado un estrecho segmento dentro de VP1, comprendido entre los residuos aminoacídicos 140-160, que contiene los epitopes más importantes para la inducción de AN. Una segunda región ubicada en el extremo carboxiterminal (residuos 200-213) también ha sido implicada en este proceso, pero su potencialidad antigénica es menor (68, 140).

Recientemente, investigaciones llevadas a cabo con anticuerpos monoclonales (AM) han determinado la existencia de otros epitopes sobre VP2 y VP3 (25, 104, 172).

#### **I.1.5. Respuesta inmune de ratones al VFA**

Los ratones adultos no son susceptibles a la infección natural pero pueden ser experimentalmente infectados (55, 168, 169); 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 (76). A partir del momento en que se detecta un aumento significativo de AN, se observa una rápida disminución del virus en sangre y órganos hasta su desaparición total. Esta relación entre AN y desaparición de viremia se ve confirmada por la correlación entre el retraso en la aparición de AN y la prolongación de la viremia en animales irradiados e infectados y luego reconstituidos con células inmunocompetentes de ratones inmunizados con virus activo (31).

El rol de las células T en la respuesta inmune al VFA en bovinos no ha sido estudiado en profundidad (179), sin embargo se han realizado estudios en animales de experimentación como cobayos (82, 107) y ratones (47). Estos sugieren que el sistema de células T cumple un papel importante en los mecanismos de defensa contra el VFA, particularmente en el establecimiento de memoria inmunológica. Se ha determinado que las células T no son necesarias en la eliminación viral y que células B purificadas de ratones infectados son capaces

de abortar la viremia en ratones singeneicos previamente irradiados e infectados. Más aún, ratones congénitamente atímicos *nu/nu* mostraron el mismo patrón de infección viral que sus hermanos eutímicos *nu/+* (30).

En ratones, la comparación de la respuesta al VFA activo e inactivado demuestra que el VFA activo induce inmunidad protectora de por vida, mientras que el VFA inactivado en dosis bajas (0,1µg) lo hace por un periodo de tiempo muy breve. Asimismo, la fuerte inmunidad inducida por la infección viral parece no ser el resultado de persistencia viral (112).

También se ha demostrado que la respuesta inmune inducida por la infección experimental o por inmunización con altas dosis de VFA inactivado (10µg) es similar, pudiendo linfocitos B provenientes de estos animales eliminar la infección en receptores inmunodeprimidos, sin intervención de linfocitos T. Por lo contrario, la respuesta a la infección mediada por células sensibilizadas con bajas dosis de virus inactivado (0,1µg) es eficiente sólo cuando las células T son específicamente sensibilizadas (141).

## **I.2. Fiebre Aftosa**

La Fiebre Aftosa (FA) es una de las enfermedades del ganado doméstico que mayores daños económicos causa en el mundo.

### **I.2.1. La enfermedad producida por el VFA**

El VFA es el agente causal de la FA, enfermedad que afecta principalmente a animales de pezuña hendida, en particular, ganado porcino, bovino, ovino y caprino (15, 138, 157).

La mortalidad debida al VFA, con excepción de animales jóvenes, es usualmente insignificante. Sin embargo el alto grado de morbilidad y subsecuente 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 (128).

En 1897 Loeffler y Frosch (111) lograron demostrar que la FA es causada por un virus filtrable; pero el registro más antiguo de esta enfermedad corresponde a la observación de un brote de una enfermedad en bovinos, ocurrido en Italia en 1546, con idénticos signos clínicos a los que presenta la FA (80).

La FA es una enfermedad aguda, febril y muy contagiosa. 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 (40, 52). Asimismo, pájaros y vientos han sido implicados en el transporte de virus desde largas distancias en Europa (163) y también se ha informado sobre la capacidad potencial de contagio de la enfermedad por virus presente en el aire (160).

El virus penetra por vía respiratoria o a través de los epitelios de boca y nariz y luego de un corto periodo 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 con acceso febril elevado acompañado de aftas secundarias, acentuadas en pezuñas, lengua y paladar. En animales jóvenes el miocardio puede verse afectado y en algunos casos provoca su muerte (15).

Las lesiones características de la FA en la boca y lengua (llagas) resultan en una 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 (51). Como consecuencia de estos procesos el rendimiento económico de los animales enfermos puede disminuir hasta en un 25%.

En los animales infectados se eleva el nivel de AN circulantes y el virus desaparece del torrente sanguíneo, pero no necesariamente de los tejidos.

Transcurrida la fase aguda, los animales pueden convertirse en portadores del VFA, aislándose virus de las secreciones esofagofaríngeas por largos periodos (14, 88, 150).

La duración del estado portador varía según los informes y parecería depender del tipo viral utilizado en la infección. Burrows determinó que la persistencia es de 15 meses en bovinos y de 4 meses en ovinos (40).

Sadir y colaboradores (156) detectaron virus en bovinos hasta los 3 meses post-infección en líquido esofagofaríngeo por infectividad, luego del tratamiento del material extraído con triclorotrifluoroetano para disociar complejos inmunes. Sin embargo utilizando una sonda molecular en estos animales se detectó ARN viral hasta los 560 días post-infección (150).

En animales infectados persistentemente con VFA C3 se detectaron variaciones en la secuencia nucleotídica del ARN viral que se correlacionaron con cambios de antigenicidad detectables por AM (88). Estos cambios en la antigenicidad debidos a la presión selectiva del sistema inmune del hospedador portador y la alta tasa de mutación del VFA (144) podrían ser las causas de la aparición de nuevos subtipos en la naturaleza (72).

### **I.2.2. 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 el norte de Panamá (129).

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 expuestos (51). Aún cuando estos procedimientos son muy costosos, los perjuicios que acarrea la FA endémica justifican tal inversión (115).

La mayoría de los países en los cuales la enfermedad es enzoótica o que están expuestos repetidamente a contaminaciones provenientes del exterior, procuran 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 (38). Un método que combina el sacrificio de los animales infectados con la vacunación zonal alrededor del foco infeccioso se practica en algunos países como Dinamarca y también fue utilizado para suprimir el extenso brote que ocurrió en México de 1946 a 1953 (15).

En los países de la Comunidad Económica Europea se suspendió la vacunación antiaftosa en junio de 1991, luego del éxito alcanzado en el control de la enfermedad. En América del Sur 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 (45).

### **I.3. Vacunas contra el VFA**

La gran mayoría de las vacunas contra el VFA se basan en la utilización de virus inactivado (22).

### I.3.1. Vacunas en uso

Es necesario que se cumplan 3 requerimientos cruciales para la producción de vacunas a virus inactivado; en primer lugar se debe disponer de Ag viral en alta concentración y cantidad suficiente para permitir la producción de vacunas en gran escala; en segundo lugar, la preparación viral debe ser inactivada de forma total y en tercer lugar se debe agregar un adyuvante que estimule, evitando efectos tóxicos, la respuesta inmune del animal hasta los niveles de protección deseados.

El VFA puede obtenerse de epitelio lingual de bovinos infectados en alta concentración y cantidades suficientes como para comenzar a producir vacunas (174, 178). El virus así obtenido fue la única fuente de Ag viral hasta principios de la década del '50 cuando Frenkel desarrolló el sistema que lleva su nombre: una vacuna basada en la producción en gran escala de Ag "in vitro" en epitelio lingual bovino (83). Este método fue rápidamente aplicado en Francia (90), en Argentina (149) y también algunos laboratorios europeos introdujeron esta tecnología, permitiendo la implementación de programas de vacunación.

En la década del '60 se desarrollaron métodos de producción de virus basados en cultivos primarios de células (173) y cultivos de líneas celulares como BHK-21 (165), que son los más utilizados actualmente. No obstante en algunos países se continúa utilizando el método Frenkel. Las líneas celulares IBRS2 (células de riñón de cerdo) (63), HmLu (células de pulmón de hamster) (166) y NIL-2 (células de embrión de hamster) (65) también fueron adaptadas al crecimiento en suspensión y son todas eficientes productoras del VFA. Hasta el momento la última, conocida también como IFFA3, y BHK-21 son ampliamente utilizadas para la producción de vacunas (75).

Vallée y colaboradores (174), en la década del '20, indicaron que el VFA puede ser inactivado con formaldehído sin perder su capacidad inmunizante. Sin embargo se demostró que la inactivación con formaldehído es un proceso no lineal, existiendo el riesgo de que

persista una fracción de virus residual no inactivado (37). Puede ocurrir tanto la permanencia de infección residual como la pérdida de potencialidad inmunizante de la preparación.

Otros procedimientos de inactivación utilizan aziridinas, como acetiletlenimina (37), etilenimina y propilenimina (18), que resultan menos riesgosos que aquellos basados en el uso de formaldehído. La inactivación es rápida con una cinética de primer orden que permite extrapolar y predecir la seguridad del proceso.

Las aziridinas son altamente tóxicas, lo que previene su uso; afortunadamente el bromhidrato de bromoetilenamina (BEA), que es relativamente no peligroso, puede sustituirlas.

La potencial presencia de actividad viral residual es testeada por inoculación de cultivos de células altamente susceptibles, por ejemplo, BHK-21 (10) o células de tiroides fetal bovina (142).

Comercialmente, sólo 3 adyuvantes son utilizados para la elaboración de vacunas antiaftosa: 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 (85) donde el Ag es emulsificado en un aceite mineral (22).

Las primeras vacunas monovalentes acuosas tenían un volumen por dosis de 60 ml con 50% de gel de hidróxido de aluminio. Finalmente se pudo preparar potentes vacunas trivalentes, con una dosis de 5 ml, en cultivo Frenkel, para lo cual el complejo Ag-hidróxido de aluminio se concentraba y a él se le agregaba saponina purificada (QuilA 1mg/dosis) (84). Esta vacuna indujo altos niveles de AN en bovinos (20).

La vacuna de hidróxido de aluminio resultó menos efectiva en cerdos (133, 175). Sin embargo agregando 0,5 gr de dietilaminoetil-dextrano por dosis a la formulación, la protección en cerdos fue suficiente (187).

Investigadores daneses obtuvieron una mejor protección en cerdos emulsificando el Ag en aceite mineral (adyuvante de Freund) (123). Otros investigadores encontraron que los bovinos también resultaban eficientemente protegidos con este tipo de vacunas (120). Se obtuvo una respuesta inmune más intensa y más duradera comparada con la vacuna acuosa. Los bovinos, sin embargo, desarrollaron reacciones adversas en el sitio de inoculación frente a la vacunación intramuscular (i.m.) (119). Las reacciones resultaron menos severas y comparables con aquellas observadas con vacunas acuosas cuando la administración en bovinos fue subcutánea y el volumen de la dosis reducida (121). Si se utiliza el Ag concentrado purificado, el volumen de la dosis se puede reducir a 0,1 ml y no se observan reacciones adversas (11, 127).

### **I.3.2. Vacunas experimentales**

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

#### **I.3.2.1. Vacunas formuladas con adyuvantes**

Se ha ensayado el poder adyuvante de diferentes sustancias para la elaboración de vacunas antiaftosa, ya sea con Ag viral convencional (virus inactivado) o con diferentes péptidos.

Knudsen (106) efectuó estudios de respuesta vacunal en cobayos con el VFA tipo A12 (1 $\mu$ g) adicionado con 0,001 a 10 mg de avridine (amina lipoidal sintética) vehiculizado en solución intralipídica o en buffer fosfato salino (PBS). La protección contra el desafío viral fue máxima y los niveles de Ac fueron elevados acorde a la cantidad de avridine utilizada; sin



embargo se observaron sedimentos del adyuvante al utilizarlo en PBS. Por otra parte se hicieron pruebas preliminares sobre la acción de la avridine en vacunas antiaftosa para bovinos con resultados satisfactorios (155).

Vasantha y colaboradores (177) estudiaron la respuesta de cobayos a vacunas preparadas con la proteína VP1 (100 $\mu$ g/dosis) o con viriones completos (5 $\mu$ g/dosis) de los VFA tipo Asia1 y O encapsulados en liposomas (vesículas de bicapa fosfolipídica). Cuando el Ag fue el VFA tipo O (tanto VP1 como el virión) los animales mostraron títulos de AN semejantes a aquellos de animales vacunados con los mismos Ags en adyuvante completo de Freund (ACF) hasta 50 días post-vacunación (d.p.v.); mientras que cuando el Ag fue el VFA tipo Asia1 sólo respondieron los cobayos estimulados con la formulación que incluía al virión intacto. Asimismo, cerdos vacunados con el virión completo (20 $\mu$ g/dosis) encapsulados en liposomas mantuvieron un alto nivel de Ac hasta el día 150 y 56 post-vacunación (p.v.) para los VFA tipo O y Asia1 respectivamente. La ventaja de la nueva formulación fue que no se presentaron lesiones granulomatosas en el sitio de inyección, contrariamente a lo observado con la formulación oleosa (ACF).

Los liposomas también han sido probados con péptidos sintéticos (82). Cobayos vacunados 2 veces con 30 $\mu$ g de péptido correspondiente a la región aminoacídica 141-160 de la proteína VP1 del VFA tipo O1K incorporado a liposomas mostraron actividad neutralizante asociada a presencia de Ac anti-virus y Ac anti-péptido; fenómeno que no ocurrió luego de la primovacunación con dicho inmunógeno.

Un péptido sintético representando el fragmento 141-160 de VP1 del VFA, fue polimerizado o copolimerizado con muramildipéptido-Lys (MDP; N-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina) e inyectado en ratones vehiculizado en PBS y tuvo capacidad de inducir Ac hasta el día 70 p.v. luego de 2 revacunaciones (58).

Péptidos correspondientes a la región aminoacídica 144-159 de VP<sub>1</sub> del VFA también fueron incorporados a vacunas cuya formulación incluyó ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) preformados del virus influenza (1 y 3 µg de conjugado/dosis). Las vacunas así preparadas se analizaron en ratones. Luego de la 2<sup>a</sup> vacunación se obtuvieron Ac en nivel considerable pero insuficiente para conferir protección (113).

Recientemente Wiesmüller y colaboradores (183) describieron el uso de vacunas a péptidos que consistían en un activador sintético de células B y macrófagos (P3CSS; tripalmitoil-S-gliceril-cisteinil-seril-serina) covalentemente unido a un epítipo T de VP<sub>1</sub> del VFA tipo O1K (secuencia aminoacídica 135-154). La vacuna resultante fue capaz de proteger cobayos frente a la infección con virus homólogo.

#### **1.3.2.2. Vacunas biosintéticas**

El uso como Ag vacunal de la proteína VP<sub>1</sub>, de fragmentos de ésta expresados en bacterias u otros sistemas (29, 60, 108) ha encontrado grandes dificultades, entre las que se pueden citar la necesidad de administrar mayor cantidad de Ag vacunal para lograr respuesta o la inducción de altos títulos de AN pero poco protectores. Estos problemas de inmunogenicidad podrían deberse a la ausencia de algunos epítopes humorales y/o celulares requeridos para la inducción de protección (69).

Para lograr presentar el péptido en una configuración que fuera una mímica de aquella que, se asume, tiene en el virus nativo, se expresó como proteína de fusión uniéndolo al extremo amino terminal de β-galactosidasa (32, 186). Esta proteína de fusión se expresó satisfactoriamente en *E. coli*, pero el producto no resultó más inmunogénico que el péptido solo o unido a keyhole limpet haemocyanin (KLH), en tanto que la misma proteína de fusión conteniendo dímeros o trimeros del péptido resultó efectiva (33).

Uno de los mejores resultados se ha conseguido por medio del uso de una proteína de fusión, expresada en el virus vaccinia, correspondiente a los aa 142-160 de VP1 del VFA tipo O1K junto con la proteína del "core" del virus de la hepatitis B (46). La capacidad de esta proteína de fusión de producir AN en cobayos fue comparable a la del virión completo.

Agterberg y colaboradores (2) construyeron híbridos con la proteína phoE de la membrana externa de *E. coli* y diferentes combinaciones de secuencias de VP1 del VFA tipo A10 (aa 200-207; 141-153; 141-160) en plásmidos. Sólo la construcción proteína phoE -aa 200-207-aa 141-160 resultó buen inmunógeno logrando inducir AN.

Recientemente Kitson y colaboradores (103) han construido recombinantes de poliovirus con diferentes secuencias correspondientes a sitios antigénicos del VFA. Recuperaron virus viable de 4 plásmidos en los cuales parte de la proteína VP1 del poliovirus tipo1 Sabin fue reemplazada por secuencias derivadas de la proteína VP1 del VFA tipo O1K (residuos 141-154; 147-156; 140-160 y 40-49). Una de estas quimeras (la que contenía la secuencia 140-160) fue neutralizada por Ac específicos anti-aftosa y, además, fue capaz de inducir protección contra el desafío viral en cobayos.

### **I.3.2.3. Vacunas a péptidos sintéticos**

En 1982 los epitopes secuenciales de VP1 del VFA fueron descritos por primera vez (167).

Péptidos, correspondientes a estos epitopes, fueron acoplados a proteínas carriers como KLH para estimular la respuesta inmune. Los péptidos correspondientes a los fragmentos 200-213 y 140-160 indujeron AN y protegieron cobayos frente al desafío viral (27, 140).

Francis y colaboradores (81) han demostrado que ratones no sensibles a la inmunización con el péptido 141-160 de VP1 son capaces de reconocer este péptido cuando va acompañado

de un epítopo T de ovoalbúmina o mioglobina de ballena de esperma. Asimismo, tanto la actividad de las células T como la de los linfocitos B de memoria se inducían sólo cuando el péptido 141-160 contenía una cisteína adicional en su extremo carboxilo terminal (81).

Con el objeto de mejorar la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos se han realizado construcciones tendientes a mimetizar la conformación nativa de los aa 135-160 de VP1 uniendo dicha región a los aa 200-213 de VP1 (66, 68).

Los experimentos en bovinos siempre han sido desalentadores. Los mejores resultados fueron obtenidos con péptidos correspondientes a las regiones 141-158 y 200-213 de VP1 del VFA tipo O1 covalentemente unidos entre ellos. Los péptidos, sin proteína carrier adicional, fueron emulsificados en adyuvante inmcompleto de Freund (AIF). Bovinos que recibieron 5 mg de péptido, o que fueron vacunados 2 veces con cantidades menores, desarrollaron altos niveles de AN; sin embargo no se obtuvo protección total contra el desafío (66).

Si bien los resultados de las pruebas de inmunidad han revelado que las vacunas a péptidos deben contener de 100 a 1000 veces más cantidad de Ag que las vacunas convencionales para producir una respuesta semejante, el desarrollo de una vacuna a péptidos eficiente brindaría la disponibilidad de un producto estable, resistente a condiciones adversas, de composición definida y sin riesgo de infectividad residual.

#### **I.4. Adyuvantes**

En una primera definición, Ramón en 1926 (146), sostuvo que un adyuvante era cualquier sustancia que, agregada junto a un Ag específico en una vacuna, incrementaba los niveles de inmunidad por sobre los desarrollados por la vacuna formulada sólo con el Ag. Actualmente esta definición se ve ampliada para incluir cualquier sustancia que actúa por un lado sobre un hapteno o un Ag aumentando sus propiedades inmunogénicas, o, por otro lado, sobre las células comprometidas en la respuesta inmune (98).

El desarrollo de los adyuvantes fue hasta hace poco bastante empírico. Se encontraron muchas sustancias capaces de modular la respuesta inmune. Estos componentes son notablemente diversos, tanto en su composición como en su mecanismo de acción, lo cual dificulta su clasificación.

#### **I.4.1. Modos de acción**

La literatura indica que hay sustancias de diferente naturaleza con propiedades adyuvantes, sin embargo no existe unificación en lo que concierne a su modo de acción. Los adyuvantes pueden actuar a nivel del Ag o sobre las células del hospedador involucradas en la respuesta inmune.

##### **I.4.1.1. Acción de los adyuvantes sobre el Ag**

1.-Modificaciones conformacionales: Existen sustancias adyuvantes que pueden modificar al Ag por cambios estructurales o alterando su carga eléctrica (98). Los adyuvantes oleosos o las bases alquílicas pueden inducir este tipo de modificaciones en Ags proteicos. Se demostró también que aumentando la hidrofobicidad de un Ag se incrementaba la respuesta mediada por células (49).

2.-Transformación de haptenos: Varias sustancias adyuvantes pueden transformar haptenos no inmunogénicos en inmunogénicos. Es aceptado que un inmunógeno consta de una porción antigénica (hapteno) y una segunda porción adyuvante (98). Los inmunógenos potentes poseen esta parte adyuvante intrínsecamente, pero con el desarrollo de nuevas vacunas sintéticas el componente adyuvante intrínseco puede no existir, de allí la necesidad de agregárselo (71). Se pueden anexas cadenas hidrofóbicas a proteínas por acilación, 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 confiere ventajas inmunogénicas, no sólo porque los agregados de proteínas son inmunogénicos más que tolerogénicos, sino también porque las proteínas unidas a macrófagos son más estimulantes del sistema inmune que libres en solución (95). Esto se logra, por ejemplo, con conjugados proteínas-ácidos grasos o con liposomas.

3.-Desnaturalización o particularización de Ags: Algunas sustancias con poder adyuvante pueden inducir la desnaturalización o particularización de Ags, y los Ags desnaturalizados se asocian fácilmente a membranas de macrófagos o células dendríticas de nódulos linfoides o bazo. Esto podría facilitar la presentación del Ag a linfocitos (5). Ciertos Ags pueden desnaturalizarse por emulsificación o particularizarse por adsorción en aluminio, bentonita u otras partículas.

#### **I.4.1.2. Acción de los adyuvantes sobre el hospedador**

1.-Liberación lenta del Ag: Este es el mecanismo más preconizado para todos aquellos adyuvantes denominados genéricamente de deposición (91). La continua liberación de pequeñas cantidades de Ag semejaría una suerte de reestímulos, lo que induciría memoria inmunológica. Actúan así, principalmente, las sales de aluminio y las emulsiones agua en aceite (5, 26).

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, lo que trae aparejado un aumento en la probabilidad de que ocurra la activación de aquellos linfocitos capaces de reconocer específicamente al Ag que se inocula junto con el adyuvante. Se comprobó que la célula "target" o blanco para la inducción de este fenómeno es el macrófago (86) que, estimulado, liberaría monoquinas que, directa o

indirectamente (por la estimulación de linfocitos con la consiguiente liberación de linfoquinas), produciría un efecto quimiotáctico sobre los linfocitos circulantes y su acumulación en un sitio determinado. Este mecanismo es inducido por adyuvantes tales como el ACF y *Corynebacterium parvum* entre otros (109).

3.-Modificación de membranas celulares: Muchos adyuvantes son agentes activantes de superficie, contienen partes lipo e hidrofílicas separadas. Pueden actuar para unir Ag a membrana celular y pueden facilitar el contacto y tal vez la formación de puentes temporarios entre células colaboradoras, como macrófagos y linfocitos (71, 87). Facilitan la liberación de linfo y monoquinas. Varios agentes que se sabe que dañan las membranas lisosomales tienen un marcado efecto adyuvante. Esta propiedad la poseen endotoxinas, saponinas y Vitamina A (retinol) entre otros.

4.-Acción sobre las células involucradas en la respuesta inmune: Los adyuvantes pueden actuar sobre las células involucradas en la respuesta inmune. Estas células incluyen macrófagos fijos y en circulación, células de Langerhan, células dendríticas, linfocitos T y sus subpoblaciones (helper, supresores, citotóxicos y efectores), células plasmáticas, células natural killer, killer, otras células de procesos inflamatorios (neutrófilos, basófilos, eosinófilos) y a todas las variedades de linfocitos B (71). Un único tipo celular puede, por acción de un adyuvante, comportarse diferencialmente, cambiar receptores de superficie o liberar mediadores químicos (71). La célula blanco para la mayoría de los adyuvantes es el macrófago. Muchos adyuvantes afectan estas células alterando la producción de nucleótidos cíclicos. Tanto la proliferación de macrófagos y linfocitos como la activación de macrófagos está promovida por GMPc y antagonizada por AMPc (94). Adyuvantes como lipopolisacáridos (LPS) y ACF pueden estimular la expresión de glicoproteínas codificadas por genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que deben ser reconocidas conjuntamente con el Ag para que se produzca la interacción entre macrófagos y linfocitos T (180). Se acepta que el MDP y análogos con actividad adyuvante inducen la producción de interleuquina (IL) - 1 por

células mononucleares de sangre periférica humana (136). La avridine puede actuar como cofactor de linfoquinas o inducir la producción de IL-1 (97).

5.-Modificación de la clase o subclase de inmunoglobulinas (Igs) producidos: Las diferentes clases de Igs tienen diferentes funciones; Igs de clase G pasan del compartimento vascular al extravascular más fácilmente que los de clase M y sólo los primeros se transfieren a través de la placenta a fetos o por calostro a animales recién nacidos. Igs de algunos isotipos activan eficientemente el complemento, se unen a receptores de gran afinidad en monocitos y actúan sinérgicamente con células efectoras cuya actividad citotóxica es dependiente de Acs. Por ejemplo Acs IgG2a confieren mejor protección contra tumores que Acs de otros isotipos (99). Esta misma subclase de Acs también está involucrada en la protección contra varios agentes infecciosos (182). Adyuvantes como el ACF, producen mayores niveles de IgG1 que de IgG2 en cobayos, mientras que con el AIF se logra lo inverso (5). La mayoría de los LPSs inducen predominantemente IgG1 en ratón (101); sin embargo Karch y Nixdorff (100) reportaron que aumentando el largo de la cadena de polisacáridos del LPS se aumenta la respuesta IgG2.

#### **I.4.2. Efectos indeseados de los adyuvantes**

Reacciones en el sitio de inyección : La primer complicación del uso de adyuvantes es el daño agudo o subagudo del tejido en el sitio de inyección o una reacción granulomatosa posterior. Muchos adyuvantes activadores de superficie producen daño tisular. Un ensayo conveniente es la medición del nivel de creatina fosfoquinasa en circulación luego de la inyección i.m. (42). Los granulomas pueden ser evaluados por examinación histológica a diferentes tiempos p.v. o midiendo enzimas leucocíticas luego de la inoculación i.m.(62).

Pirogenicidad : Un segundo efecto indeseable de los adyuvantes es la pirogenicidad. Algunos adyuvantes como el MDP o los LPSs son pirogénicos; sin embargo, algunos de los



análogos sintéticos del MDP, incluyendo al murabutido (59) y el N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ([Thr]-MDP) (6) son potentes adyuvantes con reducida pirogenicidad comparada con la producida por el MDP (181). Los derivados monofosforiles del lípido A de LPS retienen su actividad adyuvante con reducida pirogenicidad (147).

**Uveitis anterior :** El síndrome de Reiter, un complejo que incluye uveitis anterior, artritis y uretritis, puede ocurrir en algunos individuos cuando están expuestos a pequeñas cantidades de productos bacterianos o aún cuando toman ciertas drogas como levamisol. Este síndrome también se puede producir por la inyección i.m. de 1 mg de un análogo del MDP en humanos. Sin embargo existen otros análogos del MDP con potente poder adyuvante con baja pirogenicidad y con baja capacidad de producir uveitis. El análogo lipofílico del MDP muramitripéptido-fosfatidil-etanolamina (MTP-PE) resultó gran inductor de uveitis (181), más aún administrado en liposomas.

**Artritis :** El MDP y algunos de sus derivados pueden producir artritis adyuvante en ratas (131). Entre 130 análogos de MDP probados [Thr]-MDP mostró la mayor independencia del poder adyuvante con los efectos indeseados.

#### **I.4.3. Adyuvantes utilizados en este trabajo**

**Avridine :** La avridine es una amina lipoidal sintética que se caracteriza por ser inductora de interferón (IFN). Induce la producción de IL-1, estimula la respuesta humoral y se cree que promueve la proliferación de células linfoides (154). Administrada oral o entéricamente en ratones y ratas, la avridine produce un importante incremento en la inmunidad mucosa específica (151). Se sabe que la avridine no actúa directamente sobre los linfocitos B para causar una respuesta humoral policlonal (97). Agregando la droga a células natural killer de bazo de ratas se logró mayor capacidad para matar células blanco tumorales (97) y se interpreta como evidencia de la acción del IFN. Estudios in vivo de este adyuvante mostraron

migración de leucocitos al sitio de inoculación y expansión de nódulos linfoides regionales. La actividad proliferativa de linfocitos B y T observada sugiere que la droga causa expansión de clones inmunoreactivos (8, 9). Por otra parte este adyuvante activa a macrófagos para la secreción de IFN (134).

Lipopolisacáridos: El LPS es una sustancia con poder adyuvante extraída de la pared celular de bacterias Gram negativas. Sus propiedades antigénicas radicarían en su habilidad de estimular la producción y la liberación de monoquinas por los macrófagos (180), también actúan aumentando o inhibiendo la expresión del Ag del CMH de clase 2 Ia (190). Es un mitógeno policlonal de células B (89), pero también puede estimular la inmunidad mediada por células (135). Se postula que las propiedades biológicas del LPS, incluyendo su efecto adyuvante, residen en el lípido A (61). El LPS estimula también la producción de IFN y activa Complemento por ambas vías (clásica y alterna). El LPS de *Brucella abortus* es, contrariamente al de *E. coli*, poco pirogénico, no es letalmente tóxico para conejos o embriones de pollo y no induce reacción de Schwartman (110). Por otra parte el LPS de *Brucella abortus* es letalmente tóxico para ratones C3H/HeJ y es activador policlonal y mitógeno para las células de bazo de esta cepa de ratones (126). Este comportamiento diferencial podría deberse a la composición del lípido A que se caracteriza por poseer una relativamente larga cadena de ácidos grasos saturados y no saturados, la presencia de ácido lactobacílico, pequeña cantidad de ácidos grasos hidroxilados, ausencia de ácido  $\beta$ -OH mirístico y proporciones de ácidos grasos unidos a ésteres y grupos amida diferentes a aquellos encontrados en el lípido A de *E. coli*. El LPS de *Brucella abortus* fue totalmente inactivo en ratones nude y C3H/HeJ, lo que separa claramente la capacidad del LPS de actuar como mitógeno de células B y activador policlonal de su actividad adyuvante (126). La célula blanco de acción del LPS para inducir respuesta de Acs positiva a serolbúmina bovina (BSA) es la célula T (7). Específicamente en este trabajo utilizamos el LPS de *Brucella ovis* el cual no ha sido probado como adyuvante hasta el momento y no da reacción cruzada con *Brucella abortus*

Pared celular de *Mycobacterium*: Durante años se ha conocido a *Mycobacterium* por causar tanto estimulación (ACF, Bacillus Calmette Guerin (BCG)) como depresión (tuberculosis, leprosis) del sistema inmune. Hasta hace poco tiempo fue complicado y problemático utilizar las propiedades estimulantes de productos biológicos derivados de *Mycobacterium* evitando los efectos nocivos de los mismos. La selección y mejoramiento progresivo de cepas de *Mycobacterium* no patogénicas, junto con el desarrollo de técnicas de crecimiento y extracción, pueden básicamente eliminar estos efectos colaterales (Vetrepharm Inc. London, Canadá). Fragmentos de pared celular de *Mycobacterium* (PCM) administrados a animales no causan reacciones anafilácticas, no interfieren con la prueba de derivado de proteína purificada (PPD) para tuberculosis y la frecuencia de reacciones localizadas es de 1:1000. Estudios realizados con PCM han demostrado que este producto tiene actividad antitumoral y moduladora del sistema inmune. Emulsiones de PCM pueden activar monocitos y macrófagos (4). El estudio bioquímico de PCM mostró que está compuesto por altas concentraciones de MDP, dimicolato de trehalosa (TDM) y trimicolato de trehalosa, sustancias conocidas como potentes estimulantes del sistema inmune (4).

## II. OBJETIVO

La infección por VFA induce inmunidad por lo menos durante 18 meses (57, 156) y se caracteriza por producir altostítulos de AN. Sin embargo ninguna de las vacunas actualmente disponibles confiere más de unos pocos meses de protección (159).

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, siendo necesario vacunar en forma bi o trianual.

Es aquí donde surge la necesidad de utilizar adyuvantes, sustancias que especifica o inespecíficamente potencian la acción de una vacuna.

Este trabajo se realizó con la finalidad de obtener información sobre la influencia en la duración de inmunidad contra el VFA y el mecanismo de acción de diferentes adyuvantes como moduladores en la respuesta inmune a dicho agente en un modelo murino experimental.

Para cumplir el propósito general propuesto se debió alcanzar primero los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Definir la dosis mínima inmunizante (DMI) del VFA inactivado y purificado (VIP) en el modelo murino.
- 2.- Determinar y comparar la duración de inmunidad al VFA conferida por las diferentes formulaciones elaboradas.
- 3.- Identificar las poblaciones celulares inmunocompetentes involucradas en la memoria inmunológica estimuladas por los diferentes adyuvantes.
- 4.- Determinar las subclases de IgG inducidas por los diferentes adyuvantes.

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para un estudio posterior en el hospedador natural bovino, con el objetivo de, luego de la etapa experimental, aportar nuevos elementos para la elaboración de vacunas con mayor poder inmunogénico.

El diseño experimental utilizado consistió en :

- .- Inmunización de ratones con diferentes cantidades de VIP.
- .- Inmunización de ratones con la DMI presentada en diferentes formulaciones.
- .- Determinación del Índice seroneutralizante (ISN) a lo largo del tiempo en ratones normales y atímicos inmunizados con las diferentes vacunas.
- .- Desafío de los ratones vacunados.
- .- Reconstitución de animales inmunodeprimidos e infectados con diferentes poblaciones celulares de bazo provenientes de ratones singéneos inmunizados con las diferentes vacunas.
- .- Evaluación de las subclases de IgG inducidas por las diferentes formulaciones.

### 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 provenientes del bioterio de INTA-Castelar y ratones cepa NIH *nu/nu* (atímicos) y *nu/+* (eutímicos) de 60-90 días de edad provistos por la Comisión Nacional de Energía Atómico (CNEA).

#### III.2. Virus

Se utilizó VFA subtipo O1 Campos obtenido de epitelio lingual bovino y 2 pasajes posteriores en células BHK-21, perteneciente al cepario de INTA. Este se encuentra almacenado en el banco de nitrógeno líquido del CICV-INTA-Castelar. Su título es de  $10^{7.5}$  dosis infectante ratón lactante 50% (DIRL50%)/ml.

#### III.3. Obtención de virus

A partir del virus semilla (punto 2), se multiplicó el virus en frascos rotantes con monocapa de células BHK-21 realizando infecciones cortas, con alta MOI. Se inoculó 0,1 ml del virus semilla, se adsorbó 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 a -20°C inmediatamente. A las 12 horas se descongelaron, 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 fijación de complemento y por infectividad en ratón lactante.

### III.4. Inactivación de virus

El virus así obtenido se inactivó usando bromuro de etilénimina (BEI)(19). 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 por 48 horas a 4°C y luego se centrifugó por 30' a 4°C a 6000 r.p.m.. Por último se tituló el virus inactivado por fijación de complemento 50% (FC'50%) y se realizó el control de inocuidad en 100 ratones lactantes para descartar posible presencia de virus infectivo residual. El título viral previo a la inactivación fue siempre mayor a  $10^{7.54}$  DIRL50% y de 1/128 por FC'50%; luego de la inactivación el título por FC'50% fue de 1/64 y el control de inocuidad resultó negativo al virus.

### III.5. Purificación de virus

El virus inactivado se concentró con polietilenglicol 6000 al 7%. Se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 60' a 4°C; el pellet se resuspendió en Tris ClNa; se 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 se resuspendió en Tris ClNa y se mantuvo en nitrógeno hasta su purificación a través de un gradiente preparativo de sacarosa 10-30% p/v (25000 r.p.m., 10°C, 215'). La masa vírica obtenida se midió por absorbancia a 259nm (Monesiglio, comunicación personal). El material así obtenido fue utilizado para determinar la DMI y elaborar las vacunas con los diferentes inmunomoduladores. Para la inmunización i. p. de los animales con diferentes dosis de VIP éste se diluyó en PBS.

### III. 6. Adyuvantes utilizados

Se utilizaron tres adyuvantes comparándolos con las formulaciones convencionales (hidróxido de Aluminio y emulsión oleosa): Avridine (N,N dioctadecil-N'N'bis [2-hidroxietyl] propanediamina) (Pfizer Inc. Brasil); Extracto de pared celular de Micobacteria (PCM) (Vetrepharm Inc. London, Canadá) y Lipopolisacárido (LPS) extraído de *Brucella ovis* (gentileza del Dr. Carlos Suárez).

### III. 7. - Formulación de las diferentes vacunas

Se formularon 11 vacunas (tabla 1): La vacuna 1 es el control de dosis-respuesta al VIP, conteniendo 0,1µg VIP/dosis diluidos en PBS pH 7,5; la vacuna 2 es agua en aceite (W-O) fórmula INTA (1:1) conteniendo el Ag (0,1µg VIP/dosis) en la fase acuosa (148); la vacuna 3 es la formulación convencional hidróxido de aluminio conteniendo 0,1µg VIP/dosis (148); la vacuna 4 es emulsión W-O (1:1) conteniendo 1mg/dosis de avridine. Por ser ésta insoluble en solventes acuosos fue disuelta en etanol previo a ser agregada a la fase oleosa de la emulsión como fue descrito previamente (134), y 0,1µg VIP/dosis en la fase acuosa; la vacuna 5 es emulsión aceite en agua (O-W) (1:1) utilizando aceite de soja y arlacel C conteniendo 1mg/dosis de avridine en la fase oleosa y 0,1 µgVIP/dosis en la fase acuosa; la vacuna 6 es emulsión W-O (1:1) conteniendo 10µg PCM y 0,1µg VIP/dosis en la fase acuosa; la vacuna 7 es hidróxido de aluminio conteniendo 10µg PCM y 0,1µg VIP/dosis en la fase acuosa; la vacuna 8 es el control de PCM, contiene 10µg PCM y 0,1µg VIP/dosis en PBS; la vacuna 9 es emulsión W-O (1:1) conteniendo 20µg LPS y 0,1µg VIP/dosis en la fase acuosa; la vacuna 10 es hidróxido de aluminio conteniendo 20µg LPS y 0,1µg VIP/dosis en la fase acuosa y la vacuna 11 es el control LPS, contiene 20µg LPS y 0,1µg VIP/dosis en PBS.

En todos los casos el volumen de inóculo fue de 0,2ml de vacuna por vía i. p.



TABLA 1: Preparación de vacunas

Vacuna	Formulación	Inmunomodulador
1	PBS	—
2	Oleoso	—
3	Hidróxido	—
4	Oleoso	Avridine
5	Oleoso invertido	Avridine
6	Oleoso	PCM
7	Hidróxido	PCM
8	PBS	PCM
9	Oleoso	LPS
10	Hidróxido	LPS
11	PBS	LPS

Todas las vacunas fueron formuladas para contener 0,1µg de VIP/dosis.

### III. 8. Extracción de sangre; obtención de plasma

Los ratones adultos fueron anestesiados con éter y luego sangrados por el seno retroorbital. La sangre fue recogida en tubos heparinizados. La sangre heparinizada se centrifugó por 5' a 1500 r.p.m. a 4°C. El plasma sobrenadante se recogió con micropipeta y se guardó en viales a -20°C hasta el momento de su uso.

### III. 9. Titulaciones

i) Titulación de virus: se inocularon ratones lactantes i.m. con diluciones en base 10 del virus puro para calcular la dosis letal 50% (LD<sub>50</sub>).

ii) Titulación de AN: Se empleó el método suero fijo - virus variable para determinar el ISN (56); 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 a 4°C por 30'. Los ratones lactantes fueron inoculados i.m. con 0,05ml de esta mezcla. El ISN se determinó por la fórmula:

$$\text{ISN} = \text{Título virus} - \text{Título mezcla plasma-virus}$$

### III. 10. Duración de inmunidad

Los ratones adultos vacunados fueron sangrados 7, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 d.p.v. y se determinó el ISN de cada muestra de plasma obtenida.

### **III. 11. Desafío viral**

Los ratones vacunados fueron descargados con  $10^4$  DURL50% de VFA cepa O1 Campos por vía i.p. 210 d.p.v. Veinticuatro horas después se sangraron los animales. La sangre se diluyó 1/5 en PBS pH 7,2 y se inoculó en ratones lactantes para determinar presencia de virus. Los ratones lactantes muertos fueron tipificados por la técnica de FC'50%. Como indicador de protección se utilizó la presencia o ausencia de viremia.

### **III. 12. Obtención de Acs anti-Thy**

Se inyectaron  $10^7$  células del hibridoma N°99 productor de IgM anti-Thy lítico (ATCC) por vía i.p. a ratones que habían sido previamente inoculados por la misma vía con 0,2ml de pristane (SIGMA). Se recogió posteriormente líquido ascítico de los ratones tratados y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El líquido ascítico 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. La pureza de la fracción obtenida se determinó por electroforesis. El suero así purificado se tituló por lisis producida en células de timo de ratón mediada por complemento. La lisis celular se determinó por la técnica de exclusión con colorante azul tripán.

### **III. 13. Caracterización de poblaciones celulares**

La pureza de las poblaciones celulares B y T fue determinada por inmunofluorescencia directa. Para células B se utilizó un suero anti-Ig de ratón (GIBCO) y para células T un suero monoclonal anti-Thy (MILES-YEDA) ambos acoplados a isotiocianato de fluoresceína. Brevemente, 250000 células, suspendidas en  $50\mu\text{l}$  de PBS pH 7,2 con 10% de albúmina bovina (Sigma) y 0,15% de azida sódica (PAA), se enfrentaron con igual volumen de una dilución 1/50 del suero correspondiente por 60' a  $4^{\circ}\text{C}$  agitando cada 15'. Se lavaron las células

por centrifugación a 1200 r.p.m. durante 5' 4 veces y finalmente se resuspendió en 0,2ml de PAA y se observó al microscopio con luz ultravioleta. Se contaron 100 células por muestra en luz visible y las fluorescentes correspondientes. La pureza se expresó como:

$$\% \text{pureza} = (\text{Células fluorescentes} \times 100) / 100$$

### III. 14. Preparación de suspensiones celulares

Los bazos de los animales fueron macerados entre dos portaobjetos esmerilados y las células resuspendidas en medio 199 5% suero PEG y luego contadas en medio con azul tripán para determinar su viabilidad.

Para la obtención de células B, un total de  $200 \times 10^6$  células totales de bazo se incubaron durante 60' a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en un volumen de 10ml por caja de Petri. Luego de la incubación se recogió el sobrenadante y se lavó una vez por centrifugado a 1200 r.p.m.. Estas células no adherentes fueron tratadas con suero monoclonal anti-Thy lítico más complemento de cobayo e incubadas 30' a 37°C. Al finalizar la reacción se lavaron las células por centrifugado y se contaron en presencia de azul tripán para determinar viabilidad.

Para la obtención de células T, un total de  $400 \times 10^6$  células totales de bazo se incubaron en columna de lana de nylon durante 60' a 37°C. Las células eluidas fueron tratadas con suero de conejo anti-Ig de ratón lítico más complemento de cobayo e incubadas 30' a 37°C. Al finalizar la reacción se lavaron las células por centrifugado y se contaron en presencia de azul tripán para determinar viabilidad.

Posteriormente se caracterizaron las células tratadas frente a sueros anti-Ig y anti-Thy conjugados con fluoresceína para determinar el grado de pureza de la suspensión obtenida. La contaminación de las células B con células Thy+ fue siempre menor al 4% y la pureza de los

linfocitos B fue siempre mayor al 95%. La contaminación de la población T con células B fue siempre menor al 6% y la pureza de los linfocitos T fue siempre mayor al 93%.

### **III.15. Inmunodepresión**

Los animales adultos se irradiaron con una fuente de 200kv 14mA, perteneciente a la CNEA. La dosis utilizada fue de 600rads por ratón que es la dosis letal 50% en los ratones Balb/c utilizados en estos experimentos, determinada previamente en nuestro laboratorio (30).

### **III.16. Reconstitución de animales irradiados**

Ratones adultos Balb/c fueron irradiados, luego desafiados con  $10^4$  DURL50% por vía i.p. y por último reconstituidos con  $10^7$  células de bazo totales, B purificadas o con  $5 \times 10^6$  células T más  $5 \times 10^6$  células B provenientes de donores inmunizados previamente o vírgenes como controles. A partir del día 5 post-reconstitución (p.r.) y hasta el día 13 p.r. 2 animales por grupo reconstituido fueron sangrados a blanco, determinada la existencia de virus en sangre por inoculación en ratón lactante y calculado su ISN.

### **III.17. Test de ELISA**

Los diferentes isotipos de Igs obtenidos luego de la vacunación con las diferentes formulaciones se determinaron por medio de un test de ELISA sandwich indirecto. Se sensibilizaron placas de 96 wells con suero de captura conejo anti-VFA 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) y 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 1,5% suero normal equino)(BB). Se lavaron nuevamente las placas y se las incubó con las diluciones apropiadas, en BB, de los sueros a testear . Se lavaron 3 veces y se incubaron con sueros policlonales de cabra contra los diferentes isotipos de ratón (SIGMA) en las diluciones apropiadas en BB. Se lavaron 5 veces y se incubaron con suero anti-cabra-peroxidasa (CAPPELL). Por último se lavaron 6 veces y se revelaron con solución reveladora buffer citrato-fosfato pH 5, orthophenylene diamina dihydrochloride (OPD), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se frenó la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se leyeron las placas a 490 nm.

Para determinar el título total de Ig de los sueros se realizó un ELISA sandwich directo. Se procedió de igual manera que en el caso anterior revelando las Ig totales con suero de conejo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA).

Los títulos se expresan como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución cuya lectura al menos duplica la del blanco.

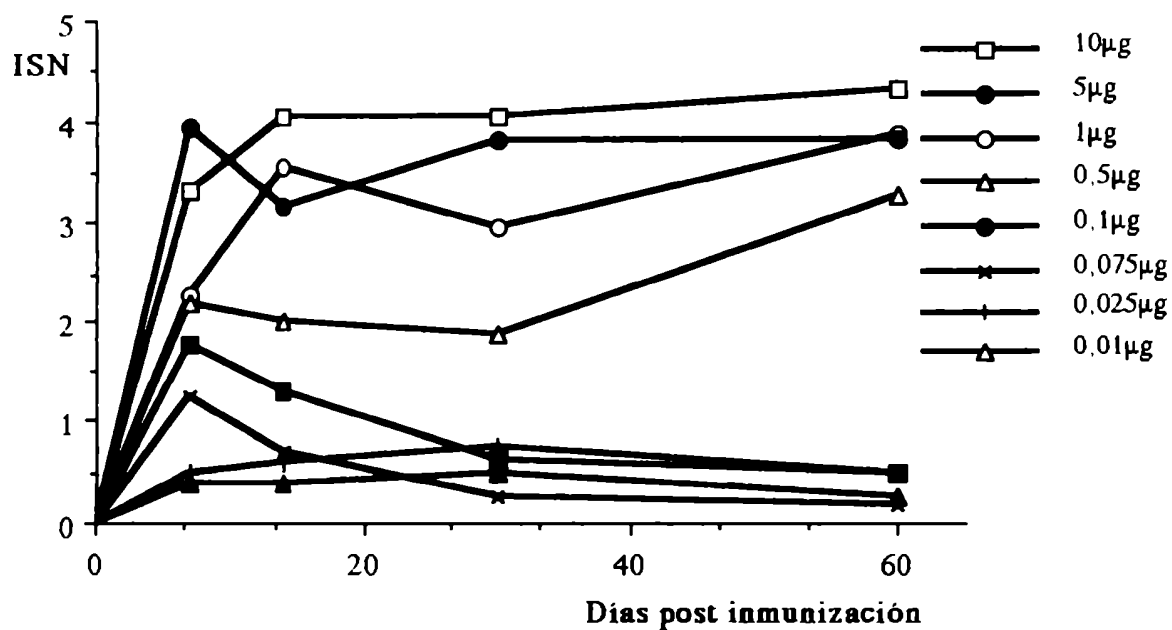
## IV. RESULTADOS

### IV.1. Determinación de la DMI

Se consideró como DMI aquella masa antigénica que provoca una respuesta inmune mínima y reproducible en los diferentes ensayos, que puede ser comparada con la respuesta obtenida con la misma masa incluida en las diferentes formulaciones de vacunas.

Con el fin de determinar la DMI se inmunizaron ratones adultos Balb/c con diferentes cantidades de VIP . Se inocularon 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,075; 0,025 y 0,01 $\mu$ g de VIP/dosis en PBS pH 7,5 por vía i.p. en un volumen de 0,2ml a diferentes grupos de animales. Estos fueron sangrados 7, 14, 30 y 60 días post-inoculación (d.p.i.); se recogió el plasma y se midió el ISN (figura 1). La respuesta a cantidades mayores a 0,1 $\mu$ g de VIP resultó elevada y duradera, mientras que cantidades menores a 0,1 $\mu$ g de VIP produjeron una respuesta baja y no repetible en diferentes experimentos. Se seleccionó como DMI 0,1 $\mu$ g de VIP, dosis que indujo una respuesta fácilmente comparable con respuestas netamente positivas. Esta cantidad de VIP/dosis fue la utilizada, entonces, para las formulaciones vacunales. Además el control biológico de la cantidad de VIP presente en cada vacuna fue la respuesta producida por la DMI en PBS.

**FIGURA 1: Respuesta de ratones Balb/c a diferentes cantidades de VFA O1 Campos inactivado y purificado**



Ratones Balb/c fueron inmunizados con diferentes cantidades de VFA O1 Campos inactivado y purificado, por vía i.p.. Siete, 14, 30 y 60 d.p.i. se obtuvo muestras de plasma de 3 ratones de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 3 mediciones.



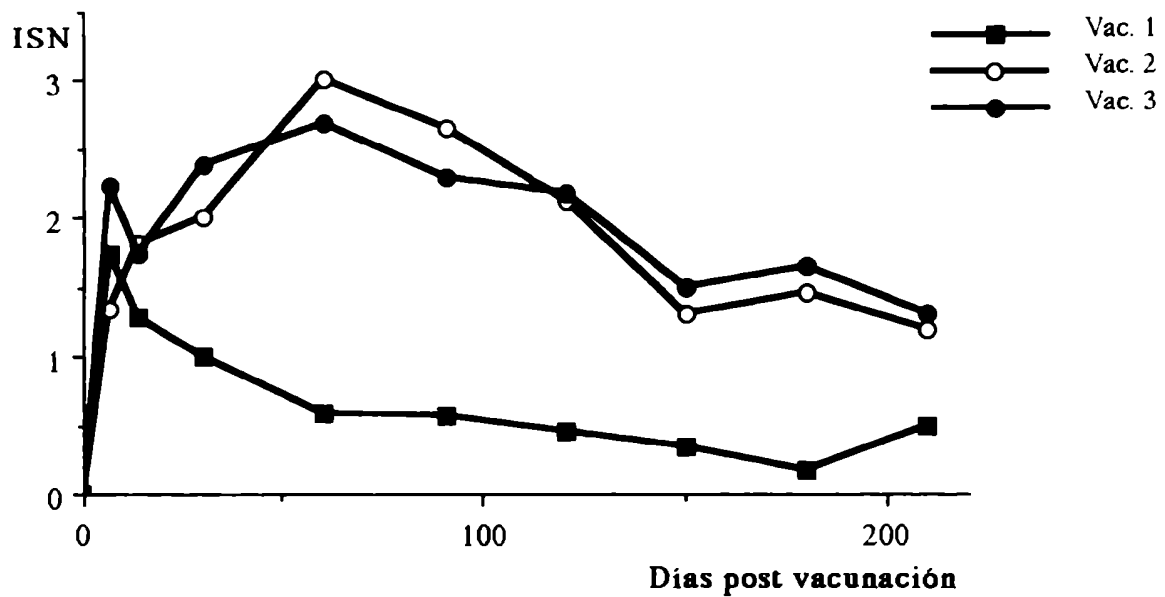
## **IV.2. Determinación de la duración de inmunidad luego de la vacunación con diferentes formulaciones en ratones Balb/c**

Se estudió la cinética de AN en ratones adultos de la línea Balb/c en respuesta a diferentes vacunas antiaftosa.

### **IV.2.1. Duración de inmunidad frente a vacunas convencionales**

En la figura 2 se ilustra la respuesta de ratones adultos Balb/c a las formulaciones oleosa y de hidróxido de aluminio convencionales, expresada como ISN.

Ambas vacunas produjeron una respuesta elevada hasta el día 120 p.v., cuando los niveles de AN comenzaron a decaer.

**FIGURA 2: Respuesta de ratones Balb/c a vacunas convencionales**

Ratones Balb/c fueron vacunados con las formulaciones convencionales oleosa (vac. 2) y de hidróxido de aluminio (vac. 3), por vía i. p.. A diferentes tiempos p. v. se obtuvo muestras de plasma de 3 ratones de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 3 mediciones.

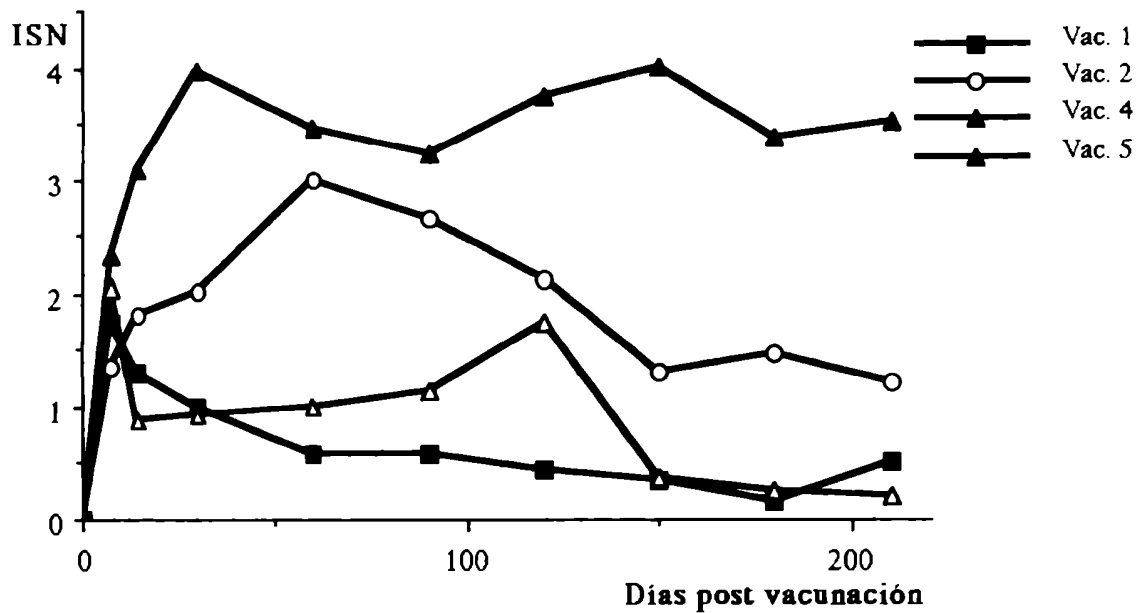
#### **IV.2.2. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con avridine**

Por ser la avridine insoluble en solventes acuosos se formularon 2 vacunas oleosas conteniendo el adyuvante en la fase oleosa (vacunas 4 y 5) disuelto previamente en etanol.

Los resultados de la inmunidad inducida por estas vacunas en ratones adultos Balb/c se muestran en la figura 3.

La emulsión clásica agua en aceite, conteniendo avridine (vacuna 4), resultó efectiva dando altos niveles de AN hasta el día 210 p. v. ( $3,75 \pm 0,33$ ), no así la formulación invertida (aceite en agua), que produjo niveles de AN menores y menos duraderos que la formulación oleosa convencional (vacuna 2) ( $1,37 \pm 0,40$ ).

**FIGURA 3: Respuesta de ratones Balb/c a vacunas elaboradas con avridine**

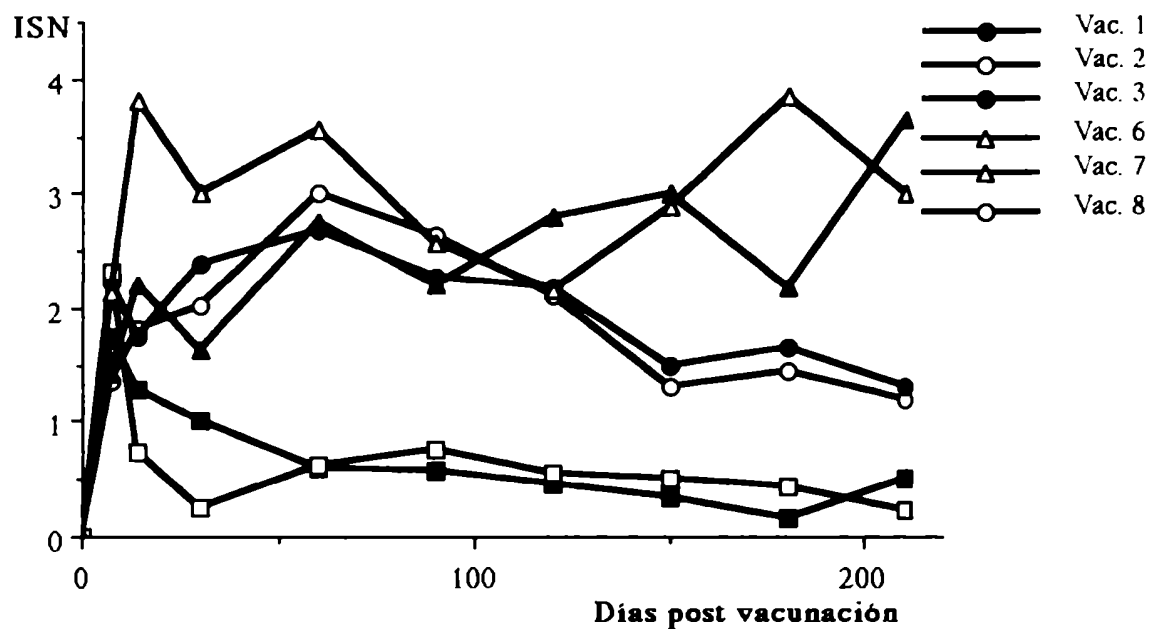


Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas oleosas conteniendo avridine [clásica agua en aceite (W-O, vac. 4) e invertida aceite en agua (O-W, vac. 5)] y con vacuna oleosa convencional (vac. 2), por vía i.p.. A diferentes tiempos p. v. se obtuvo muestras de plasma de 3 ratones de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 3 mediciones.

#### **IV.2.3. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con PCM**

Con este adyuvante (extracto de pared celular de Mycobacteria) se elaboraron 2 vacunas, oleosa y de hidróxido de aluminio (vacunas 6 y 7). Como se observa en la figura 4, ambas formulaciones resultaron más efectivas en la inducción de AN a lo largo del tiempo que las vacunas convencionales carentes de PCM, produciendo altos títulos de AN hasta el final del experimento, 210 d.p.v. ( $3,63 \pm 0,09$  vac.7;  $3,00 \pm 0,07$  vac.6;  $1,37 \pm 0,40$  vac.2 y  $1,4 \pm 0,28$  vac.3) en ratones Balb/c. El adyuvante vehiculizado en PBS no otorgó inmunidad duradera.

**FIGURA 4: Respuesta de ratones Balb/c a vacunas elaboradas con PCM**

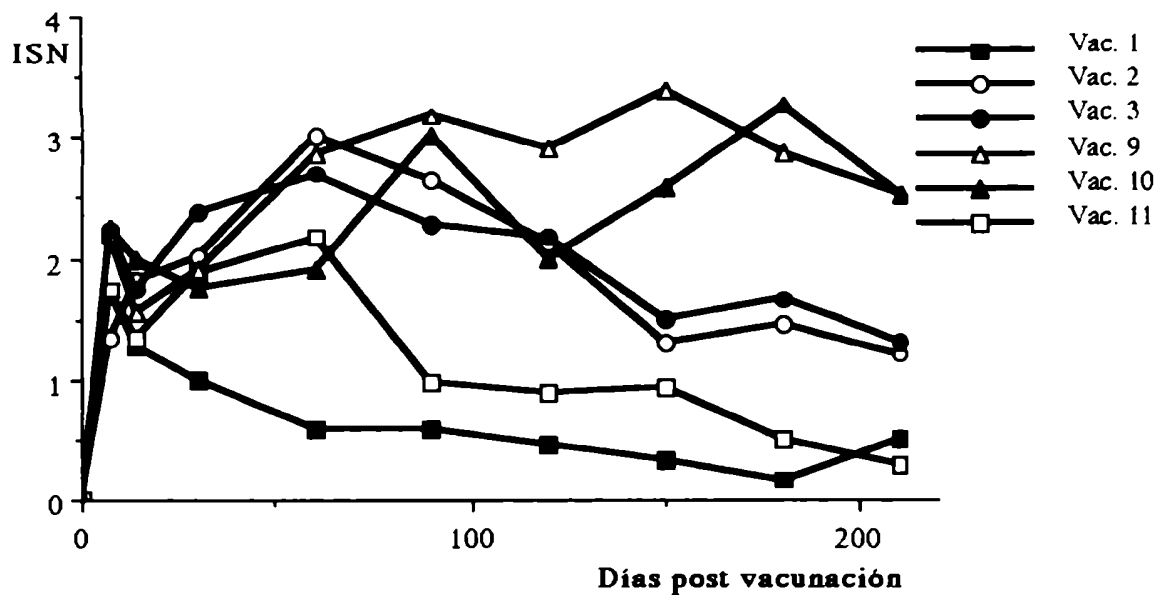


Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo PCM (vac. 6 y 7 respectivamente) y vacunas oleosa y de hidróxido de aluminio convencionales (vac. 2 y 3 respectivamente), por vía i.p.. A diferentes tiempos p.v. se obtuvo muestras de plasma de 3 ratones de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 3 mediciones.

#### IV.2.4. Duración de inmunidad frente a vacunas elaboradas con LPS

El LPS de *B. ovis* fue incluido en la formulación de vacunas oleosa y de hidróxido de aluminio (vacunas 9 y 10). En la figura 5 se muestran los niveles de AN (medidos como ISN) inducidos por estas vacunas a lo largo de 7 meses en ratones Balb/c. Tanto la formulación oleosa como de hidróxido incorporando LPS demostraron producir mayor duración de inmunidad, con altos niveles de AN, que las formulaciones convencionales sin LPS ( $2,5 \pm 0,78$  vac.9;  $2,45 \pm 0,63$  vac.10;  $1,37 \pm 0,40$  vac.2 y  $1,4 \pm 0,28$  vac.3). El LPS vehiculizado en PBS indujo una respuesta con niveles protectores de AN hasta el día 60 p.v., cuando comenzó a decaer.

**FIGURA 5: Respuesta de ratones Balb/c a vacunas elaboradas con LPS**



Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo LPS (vac. 9 y 10 respectivamente) y vacunas oleosa y de hidróxido de aluminio convencionales (vac. 2 y 3 respectivamente), por vía i.p.. A diferentes tiempos p.v. se obtuvo muestras de plasma de 3 ratones de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 3 mediciones.



### **IV. 3. Resistencia al desafío viral**

A los 210 d.p.i. de diferentes formulaciones vacunales se desafiaron los animales con  $10^4$  DURL50% de VFA por vía i.p.. Se sangraron los ratones durante 3 días consecutivos y se estudió presencia de virus en sangre con el fin de conocer el estado de protección de los animales. Los resultados se expresan en la tabla 2.

Resultaron protegidos aquellos animales vacunados con: vacuna agua en aceite conteniendo avridine (vac.4) (89%); vacunas conteniendo PCM (vac. 6 y 7) (100% y 87,5%) y vacunas conteniendo LPS (vac. 9 y 10) (62,5 y 87,5%).

TABLA 2: Resistencia al desafío viral

Vacuna	Protegidos / Desafiados	
1 DMI	0 / 5	(0%)*
2 Oleosa	2 / 9	(22%)
3 Hidróxido	2 / 10	(20%)
4 Avidine clásica	8 / 9	(89%)
5 Avidine invertida	0 / 5	(0%)
6 PCM Oleosa	8 / 8	(100%)
7 PCM Hidróxido	7 / 8	(87,5%)
8 PCM PBS	0 / 5	(0%)
9 LPS Oleosa	5 / 8	(62,5%)
10 LPS Hidróxido	7 / 8	(87,5%)
11 LPS PBS	0 / 8	(0%)

( )\* porcentaje de protección

#### **IV.4. Estudio de la respuesta secundaria de larga duración inducida por las diferentes formulaciones**

En las tablas 3, 4, 5, 6 y 7 se muestran los resultados de los experimentos de reconstitución con células esplénicas totales y B provenientes de dadores inmunizados 120 ó 180 días antes. La respuesta se mide como desaparición de viremia y aparición de AN.

Se observa que tanto las células esplénicas totales como las B provenientes de ratones inmunizados con la DMI en PBS son incapaces de transferir inmunidad a receptores irradiados a los 120 d.p.i. (tabla 3). Cuando se utiliza hidróxido de aluminio o emulsión oleosa existe un acortamiento en la viremia con células esplénicas totales de ratones vacunados 120 días antes del experimento, no así cuando se transfieren células B (tabla 3). El análisis de la respuesta secundaria inducida por los diferentes vehiculos a los 180 d.p.v., muestra que tanto las células esplénicas totales como la subpoblación de linfocitos B tienen un comportamiento similar al control negativo (animales que reciben células esplénicas totales de dadores no inmunizados) (tabla 4).

Si los dadores son inmunizados con vacunas formuladas con avridine, con PCM o con LPS tanto a los 120 (resultados no presentados) como a los 180 d.p.v. (tablas 5, 6 y 7), las células esplénicas totales y B son capaces de cortar la viremia como el control positivo (animales que reciben células totales de bazo de dadores infectados) en los animales receptores.

**TABLA 3: Reconstitución con células totales y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 120 días antes con la DMI, vacuna oleosa y vacuna de hidróxido de aluminio**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*							
		6	7	8	9	10	11	12	
Totales		++	++ (0,6)	++	++	++	++	+-	
Totales	virus activo	+-	-- (2,4)	--	--	--	--	--	
Totales	0,1µg VIP	++	++ (0,9)	++	++	++	++	--	
B	0,1µg VIP	++	++ (0,9)	++	+-	++	++	--	
Totales	vac. oleosa	++	+- (1,4)	--	--	--	--	--	
B	vac. oleosa	++	++ (0,1)	+-	++	--	--	--	
Totales	vac. hidróxido	++	++ (1,3)	--	--	--	--	--	
B	vac. hidróxido	++	+- (1,2)	+-	++	--	--	--	
--	--	++	++ (1,3)	++	++	+-	++	++	

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

( ): ISN

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

**TABLA 4: Reconstitución con células totales y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con vacuna oleosa y vacuna de hidróxido de aluminio**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*						
		6	7	8	9	10	11	12
Totales		++	++(0,2)	++	++	++	+-	--
Totales	virus activo	+-	--(2,3)	--	--	--	--	--
Totales	vac. oleosa	++	++(0,5)	++	+-	--	++	--
B	vac. oleosa	++	++(0,8)	++	+-	++	++	++
Totales	vac. hidróxido	++	++(0,3)	+-	+-	--	--	--
B	vac. hidróxido	++	++(1,0)	+-	+-	--	--	--
--	--	++	++(0,9)	++	++	+-	++	++

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

( ): ISN

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

**TABLA 5: Reconstitución con células totales y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con vacuna agua en aceite conteniendo avridine**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*							
		6	7	8	9	10	11	12	
Totales		++	++ (0,2)	++	++	++	++	+-	
Totales	virus activo	+-	-- (2,3)	--	--	--	--	--	
Totales	avridine	+-	-- (3,0)	--	--	--	--	--	
B	avridine	++	-- (2,5)	--	--	--	--	--	
--	--	++	++ (0,9)	++	++	+-	++	++	

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

( ): ISN

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

**TABLA 6: Reconstitución con células totales y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con vacuna oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo PCM**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*						
		6	7	8	9	10	11	12
Totales		++	++(0,5)	++	++	++	+-	--
Totales	virus activo	--	--(2,8)	--	--	--	--	--
Totales	PCM oleosa	++	+-(-1,5)	+-	--	--	--	--
B	PCM oleosa	++	--(-1,7)	--	--	--	--	--
Totales	PCM hidróxido	--	--(3,7)	--	--	--	--	--
B	PCM hidróxido	++	--(-1,9)	--	--	--	--	--
--	--	++	++(0,7)	++	++	+-	++	++

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

( ): ISN

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

**TABLA 7: Reconstitución con células totales y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con vacuna oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo LPS**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*							
		6	7	8	9	10	11	12	
Totales		++	++(0,7)	++	++	++	+-	--	
Totales	virus activo	+-	--(3,3)	--	--	--	--	--	
Totales	LPS-PBS	+-	+- (1,7)	+-	++	--	ND	ND	
B	LPS-PBS	++	++(0,2)	+-	+-	++	+-	--	
Totales	LPS hidróxido	+-	--(2,3)	--	--	--	--	--	
B	LPS hidróxido	++	--(2,9)	--	--	--	--	--	
--	--	++	++(0,6)	++	++	+-	++	++	

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

() : ISN

ND: no determinado

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo



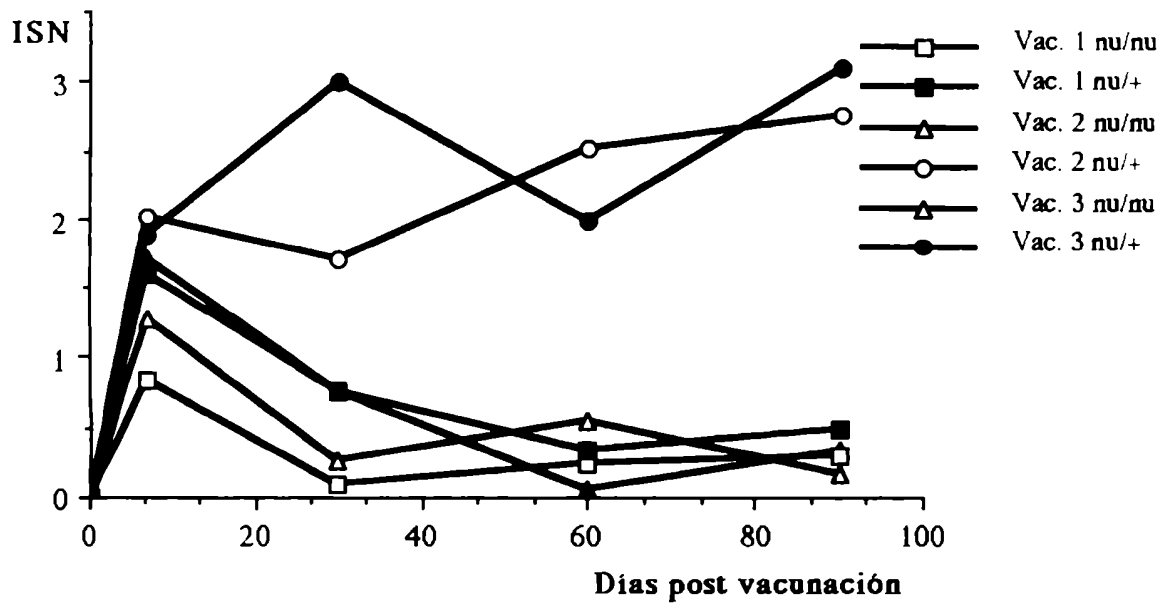
#### **IV.5. Determinación de la duración de inmunidad luego de la vacunación con diferentes formulaciones en ratones NIH *nu/nu* y *nu/+***

Con el fin de determinar la necesidad o no de la presencia de linfocitos T para efectivizar la acción de los diferentes adyuvantes se estudió la respuesta de ratones atímicos a las vacunas formuladas.

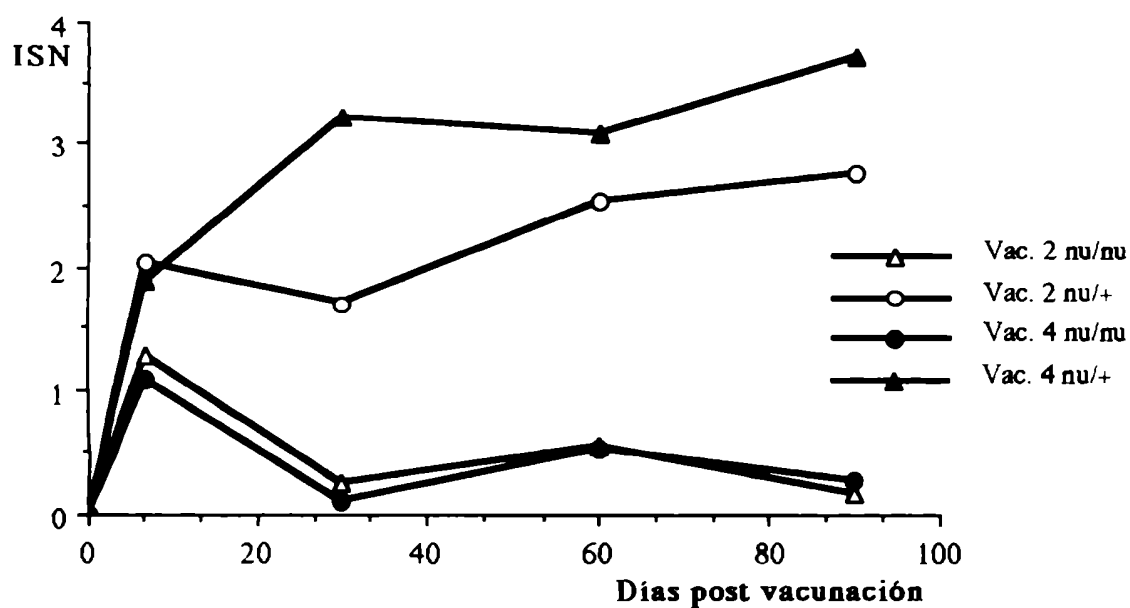
Ratones NIH *nu/nu* y *nu/+* fueron vacunados con las diferentes formulaciones. Los resultados se ilustran en las figuras 6, 7, 8 y 9.

Todas las vacunas indujeron una respuesta eficiente en ratones eutímicos (*nu/+*), mientras que ninguna de las formulaciones produjo respuesta en los animales atímicos. Estos ratones no demostraron responder diferencialmente a aquellos inoculados con la DMI, dando una respuesta medible el día 7 p. v. luego de la cual el nivel de AN decayó.

**FIGURA 6: Respuesta de ratones NIH a vacunas convencionales**

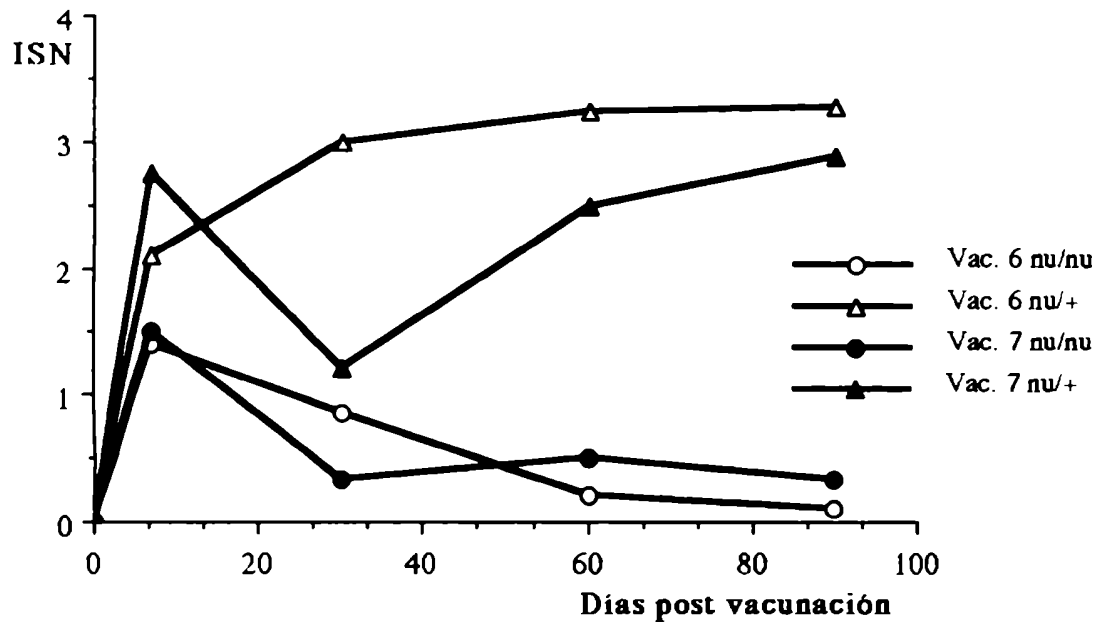


Ratones NIH atímicos (*nu/nu*) y eutímicos (*nu/+*) fueron vacunados con la DMI (vac. 1) y las formulaciones oleosa y de hidróxido de aluminio convencionales (vac. 2 y 3 respectivamente). A diferentes tiempos p.v. se obtuvo muestra de plasma de 2 animales de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 2 mediciones.

**FIGURA 7: Respuesta de ratones NIH a vacunas elaboradas con avridine**

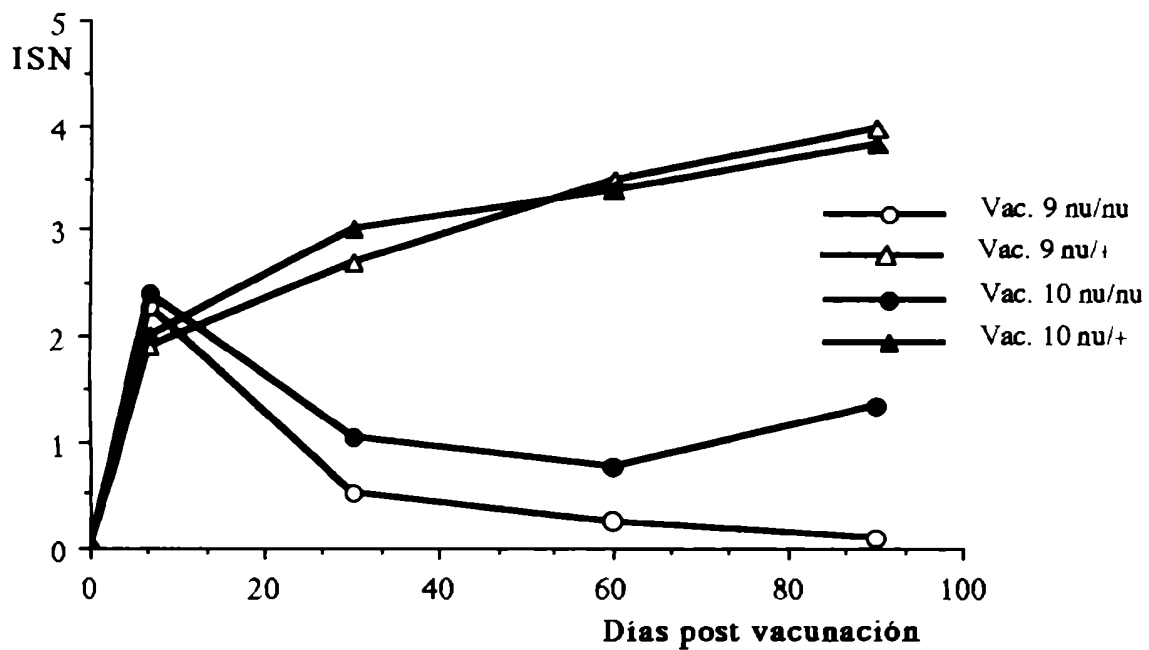
Ratones NIH atímicos (*nu/nu*) y eutímicos (*nu/+*) fueron vacunados con la formulación oleosa convencional (vac. 2) y vacuna oleosa conteniendo avridine (vac. 4). A diferentes tiempos p.v. se obtuvo muestra de plasma de 2 animales de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 2 mediciones.

**FIGURA 8: Respuesta de ratones NIH a vacunas elaboradas con PCM**



Ratones NIH atímicos (*nu/nu*) y eutímicos (*nu/+*) fueron vacunados con las formulaciones oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo PCM (vac. 6 y 7 respectivamente). A diferentes tiempos p. v. se obtuvo muestra de plasma de 2 animales de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 2 mediciones.

**FIGURA 9: Respuesta de ratones NIH a vacunas elaboradas con LPS**



Ratones NIH atímicos (*nu/nu*) y eutímicos (*nu/+*) fueron vacunados con las formulaciones oleosa y de hidróxido de aluminio conteniendo LPS (vac. 9 y 10 respectivamente). A diferentes tiempos p. v. se obtuvo muestra de plasma de 2 animales de cada grupo y se determinó su ISN. Cada punto representa el promedio de las 2 mediciones.

#### **IV.6. Estudio de la cooperación entre linfocitos T y B**

En las tablas 8 y 9 se muestran los resultados de los experimentos de reconstitución con células esplénicas T provenientes de dadores inmunizados 180 días antes agregadas a linfocitos B primados contra el VFA, pero ineficaces "per se" para eliminar la viremia en los animales receptores. La respuesta se mide como desaparición de viremia y aparición de AN. En todos los casos se repobló a los ratones receptores con  $5 \times 10^6$  células T más  $5 \times 10^6$  células B.

Se observa que las células esplénicas T provenientes de ratones inmunizados con la DMI en PBS o en vehículo de hidróxido de aluminio 180 días antes son incapaces de estimular la respuesta de linfocitos B primados 30 días antes (tabla 8). Por su parte, los linfocitos T provenientes de dadores inmunizados con formulaciones conteniendo avridine en formulación oleosa, PCM o LPS en hidróxido de aluminio 180 días antes cooperan para la producción de AN por los linfocitos B primados 30 días antes con la DMI (tabla 9), lográndose la eliminación de la viremia.

**TABLA 8: Reconstitución con células T de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con la DMI y vacuna de hidróxido de aluminio y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 30 días antes con la DMI**

Células	Immunógeno	Días post-reconstitución*						
		6	7	8	9	10	11	12
Totales		++	++(0,2)	++	++	++	++	+-
Totales	virus activo	--	--(4,5)	--	--	--	--	--
T	0,1µg VIP	++	++(0,3)	++	++	++	++	--
B	0,1µg VIP							
T	vac. hidróxido	++	++(0,4)	++	++	++	+-	--
B	0,1µg VIP							
T	0,1µg VIP	++	++(1,3)	++	++	+-	+-	--
T	vac. hidróxido	++	++(0,4)	++	++	+-	--	--
B	0,1µg VIP	++	++(0,3)	++	++	ND	ND	ND
--	--	++	++(0,5)	++	++	+-	++	++

+: presencia de viremia

--: ausencia de viremia

(): ISN

ND: no determinado

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

**TABLA 9: Reconstitución con células T de bazo de ratones inmunizados 180 días antes con vacuna agua en aceite conteniendo avidine, vacuna de hidróxido de aluminio conteniendo PCM y vacuna de hidróxido de aluminio conteniendo LPS y linfocitos B de bazo de ratones inmunizados 30 días antes con la DMI**

Células	Inmunógeno	Días post-reconstitución*							
		6	7	8	9	10	11	12	
Totales		++	++(1,1)	++	++	++	++	+-	
Totales	virus activo	--	--(3,5)	--	--	--	--	--	
T	avidine	+-	--(3,0)	--	--	ND	ND	ND	
B	0,1µg VIP								
T	PCM hidróxido	+-	--(2,5)	--	--	ND	ND	ND	
B	0,1µg VIP								
T	LPS hidróxido	++	--(1,7)	--	ND	ND	ND	ND	
B	0,1µg VIP								
T	avidine	++	++(ND)	++	++	ND	ND	ND	
T	PCM hidróxido	++	++(ND)	++	++	ND	ND	ND	
T	LPS hidróxido	++	++(0,2)	++	ND	ND	ND	ND	
B	0,1µg VIP	++	++(1,2)	++	++	ND	ND	ND	
--	--	++	++(0,8)	++	++	+-	++	++	

+: presencia de viremia

-: ausencia de viremia

( ): ISN

ND: no determinado

\*: la determinación de viremia se realiza en 2 animales por día y por grupo

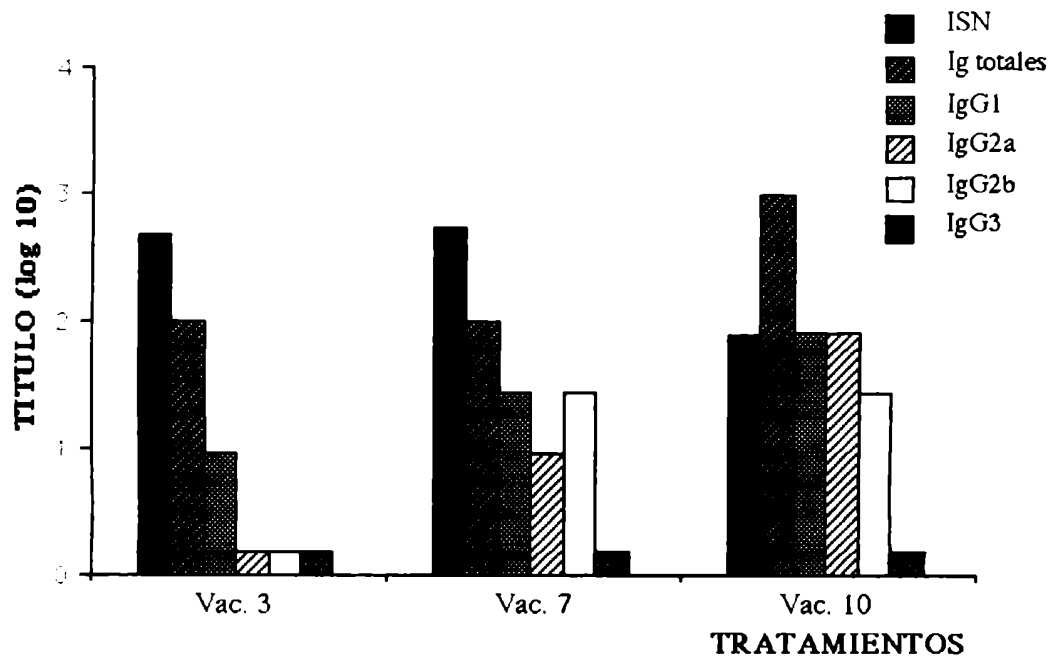


#### **IV.7. Determinación de isotipos de IgG inducidos por las diferentes formulaciones**

En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los perfiles isotípicos de IgG inducidos por las diferentes formulaciones 60 y 180 d. p. v.

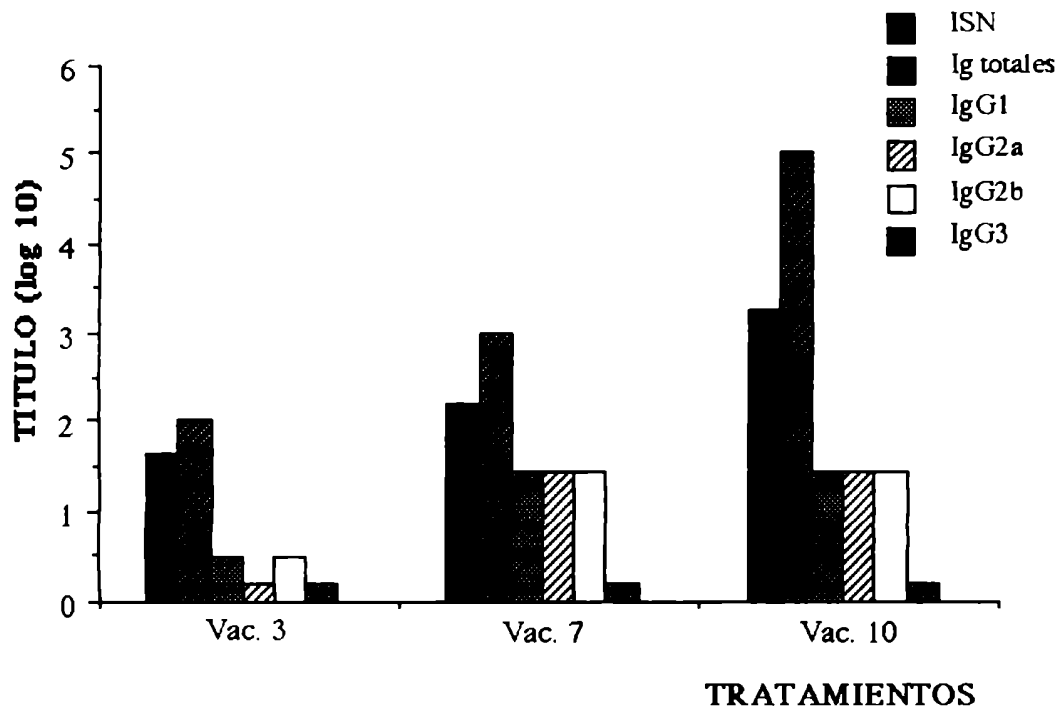
En general se ve estimulada la producción de IgG1. La producción de IgG2a y de IgG2b se ve favorecida por la inclusión de los adyuvantes en las vacunas, siendo más acentuada la diferencia entre la vacuna de hidróxido de aluminio convencional con las vacunas acuosas conteniendo PCM o LPS. La producción de IgG3 no es estimulada salvo en el caso de vacuna oleosa conteniendo PCM 180 d. p. v..

**FIGURA 10: Perfil isotípico de IgG - Hidróxido de aluminio 60 d. p. v.**



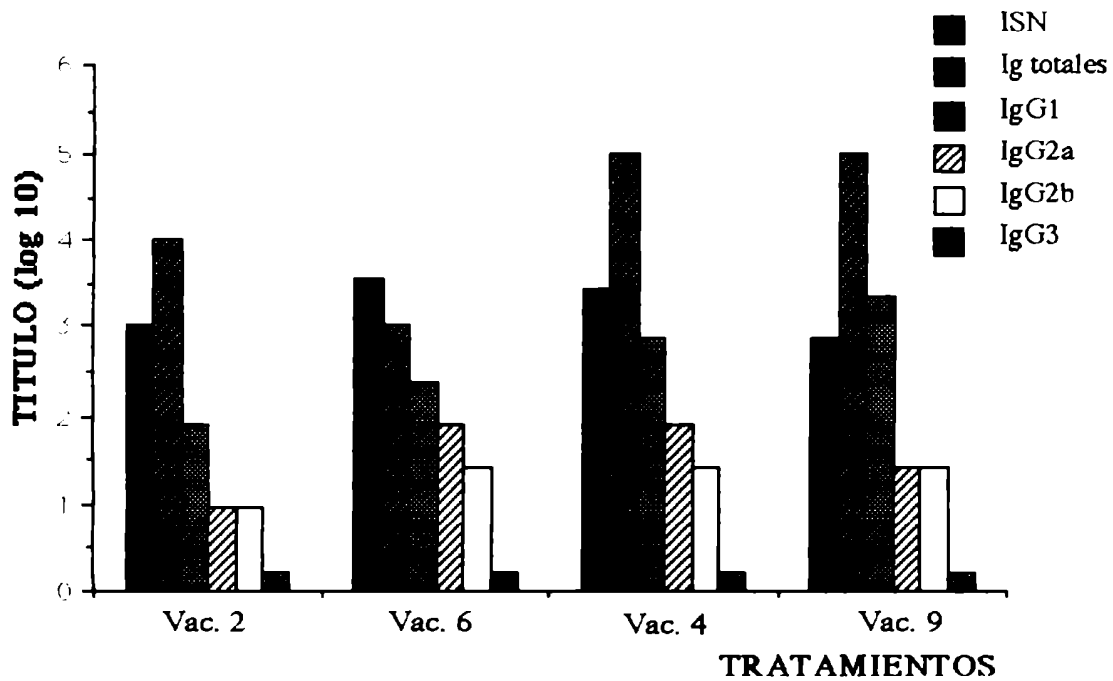
Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas acuosas (vac. 3: hidróxido de aluminio, vac. 7: hidróxido de aluminio conteniendo PCM y vac. 10: hidróxido de aluminio conteniendo LPS) y sangrados a blanco el día 60 p. v. El plasma de estos animales se analizó por el test de ELISA para determinar totalidad de Ig y los diferentes isotipos de IgG y por seroneutralización en ratón lactante para determinar el ISN.

**FIGURA 11: Perfil isotípico de IgG - Hidróxido de aluminio 180 d. p. v.**



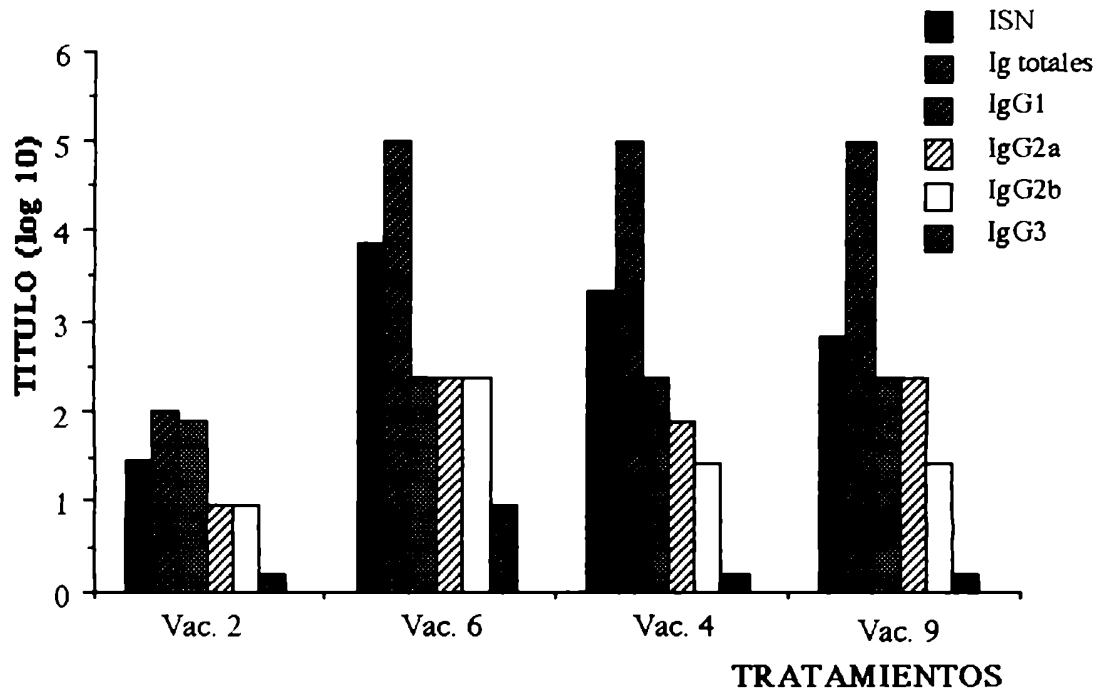
Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas acuosas (vac. 3: hidróxido de aluminio, vac. 7: hidróxido de aluminio conteniendo PCM y vac. 10: hidróxido de aluminio conteniendo LPS) y sangrados a blanco el día 180 p. v. El plasma de estos animales se analizó por el test de ELISA para determinar totalidad de Ig y los diferentes isotipos de IgG y por seroneutralización en ratón lactante para determinar el ISN.

FIGURA 12: Perfil isotípico de IgG - Vehículo oleoso 60 d.p.v.



Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas formuladas en vehículo oleoso (vac. 2: oleosa, vac. 6: oleosa conteniendo PCM, vac. 4: oleosa conteniendo avidine y vac. 9: oleosa conteniendo LPS) y sangrados a blanco el día 60 p.v.. El plasma de estos animales se analizó por el test de ELISA para determinar totalidad de Ig y los diferentes isotipos de IgG y por seroneutralización en ratón lactante para determinar el ISN.

FIGURA 13: Perfil isotípico de IgG - Vehículo oleoso 180 d. p. v.



Ratones Balb/c fueron vacunados con vacunas formuladas en vehículo oleoso (vac. 2: oleosa, vac. 6: oleosa conteniendo PCM, vac. 4: oleosa conteniendo avridine y vac. 9: oleosa conteniendo LPS) y sangrados a blanco el día 180 p. v.. El plasma de estos animales se analizó por el test de ELISA para determinar totalidad de Ig y los diferentes isotipos de IgG y por seroneutralización en ratón lactante para determinar el ISN.

## V. DISCUSION

En países latinoamericanos con sistemas de producción ganadera extensivos, las campañas de vacunación de bovinos contra el VFA se llevan a cabo tres veces al año con vacunas acuosas y dos veces al año con vacunas oleosas. En este contexto la disponibilidad de una vacuna antiaftosa que confiera mayor duración de inmunidad tendría enormes ventajas operativas para la implementación de dichas campañas.

La respuesta inmune a vacunas no involucra sólo interacciones entre diferentes tipos celulares sino también complejas interacciones mediadas por factores solubles, citoquinas. Conociendo los mecanismos que se manifiestan en una respuesta inmune óptima, se puede intentar modificar la presentación de un Ag menos inmunogénico de forma tal de mejorar la respuesta que induce, por ejemplo, con el agregado de adyuvantes. El único adyuvante autorizado para uso humano y veterinario es la sal de aluminio, sin embargo, este adyuvante no es efectivo para una gran variedad de Ags y no estimula efectivamente la inmunidad mediada por células (28). Es necesario, entonces, desarrollar adyuvantes con la eficacia del ACF pero sin sus efectos colaterales indeseados, como, por ejemplo, la formación de granulomas.

Básicamente, para lograr una formulación vacunal eficiente, se deben considerar dos factores: la elaboración del inmunógeno y la respuesta inmune del hospedador. El estudio de la respuesta inmune en bovinos se ve limitado por los altos costos que acarrea y por la escasa información disponible sobre el sistema inmune de esta especie (78). Es por ello que en nuestro laboratorio se estandarizó un modelo experimental murino en el cual la respuesta inmune al VFA puede ser estudiada (30, 31, 76, 112, 141).

En este trabajo se utilizó el modelo murino para estudiar el efecto de 3 adyuvantes diferentes (avridine, PCM y LPS) en la respuesta a vacunas antiaftosa. Se examinó la duración de inmunidad conferida, el estado de protección viral 7 meses p.v., las células

inmunocompetentes estimuladas, involucradas en la respuesta secundaria de larga duración y la composición isotópica de IgG inducida por los diferentes adyuvantes.

Avridine, PCM y LPS de *B. ovis* confirieron inmunidad duradera, con ISN altos hasta el día 210 p.v., a diferencia de las vacunas convencionales (oleosa y de hidróxido de aluminio) que confirieron inmunidad competente hasta el día 150 p.v., cuando los títulos de AN comenzaron a decaer (figuras 2, 3, 4 y 5). Cabe destacar que la inclusión de los inmunomoduladores en las formulaciones logró modificar la respuesta inmune no tanto en un aumento de la cantidad de Acs específicos como en lograr que la producción de los mismos se mantenga por mucho más tiempo. En relación directa con los ISN, resultaron protegidos aquellos animales tratados con las nuevas formulaciones vacunales (tabla 2).

Experimentos llevados a cabo en cobayos demuestran que la avridine estimula la producción de AN y protección contra el VFA (106), lo que avala nuestros resultados en el modelo murino. Por otra parte, entre los componentes del PCM se encuentra el MDP, adyuvante ampliamente estudiado y conocido. Con Ags timo dependientes como la BSA, el MDP aumenta la respuesta inmune humoral en ratones (13).

El modelo murino experimental nos ha permitido el diseño de protocolos para el estudio de la memoria inducida por el VFA activo e inactivado y purificado. Esto se ha llevado a cabo a través de experimentos de reconstitución de ratones irradiados e infectados, con células inmunocompetentes provenientes de dadores inmunizados 8 días antes. Los resultados de estos experimentos muestran que el VFA activo se comporta como un Ag timo-independiente "optativo" dado que en animales reconstituidos, las células B son suficientes para frenar la viremia, parámetro empleado para evaluar el estado de protección del animal (30). El VIP en la concentración utilizada en las vacunas (0,1µg) muestra ser un Ag timo-dependiente típico y para frenar la viremia en animales receptores es necesaria la presencia de células B y T (112).

Estos mismos ensayos se han llevado a cabo para estudiar la memoria inducida por el VIP presentado en vehículos acuoso y oleoso (hidróxido de aluminio y emulsión oleosa) con el agregado de adyuvantes. El análisis de la eficiencia en la transferencia de células inmunocompetentes a los 180 d.p.v. mostró que células B obtenidas de animales vacunados con las vacunas conteniendo tanto avridine como PCM o LPS son capaces de eliminar la viremia en receptores inmunodeprimidos e infectados, sin la colaboración de células T (tablas 5, 6 y 7). Esto sugiere que se podría mimetizar la respuesta inmune observada luego de la infección, si las vacunas elaboradas con bajas cantidades de Ag (0,1µg) incluyen inmunomoduladores adecuados. Por otro lado células B de animales inmunizados con la misma masa viral en vehículos convencionales no eliminan la viremia en ratones receptores; más aún, células totales de bazo de estos animales dadores no previenen la viremia en ratones reconstituidos (tabla 4). Esto indicaría que 180 d.p.v. con vacunas convencionales las células T no desarrollarían su función "helper".

Sin embargo, ratones atímicos NIH (*nu/nu*) respondieron frente a las diferentes vacunas sólo en los primeros d.p.v., cuando la inmunidad humoral al VFA es mediada por IgM (Smitsaart, comunicación personal)(figuras 6, 7, 8 y 9). Esto estaría denotando una T dependencia del Ag. Por otra parte el estímulo para la permanencia de altos niveles de AN en circulación resultaría también dependiente de células T. Se han probado como potenciales adyuvantes LPSs obtenidos de diferentes cepas bacterianas y existen diferencias en la acción adyuvante ejercida por LPS a Ags timo dependientes, dependiendo de la bacteria de la cual provienen (135). Si bien el LPS de *B. ovis* no ha sido estudiado previamente como inmunomodulador, se conocen las funciones adyuvantes de LPS de bacterias relacionadas, como por ejemplo las de *B. abortus*. Moreno y colaboradores (126) ensayaron la capacidad adyuvante del LPS de *B. abortus* para glóbulos rojos de carnero, Ag timo dependiente típico. Al igual que en nuestro caso ratones atímicos resultaron refractarios al efecto adyuvante, lo que es consistente con los requerimientos de células T diferenciadas para la acción adyuvante del



LPS a Acs T-dependientes (116). Nakashima y colaboradores (132) demostraron que la presencia de células T es esencial para que el LPS actúe en la iniciación de respuesta humoral a BSA. Se separan claramente la capacidad del LPS de actuar como mitógeno de células B y activador policlonal, de su capacidad adyuvante. Asimismo, se demostró que la avridine no actúa directamente sobre los linfocitos B para causar respuesta policlonal de Acs (97), con lo cual se entiende la falta de respuesta de IgG de los ratones *nu/nu* a la vacuna formulada con avridine, ya que este adyuvante requeriría la presencia de células T para estimular la inmunidad humoral.

El hecho de que células B sean capaces de transferir inmunidad es esperado ya que son las células efectoras en la eliminación viral, a través de la secreción de AN, si bien necesitan la colaboración de las células T en su etapa estimuladora. Es necesario diferenciar la acción de los adyuvantes probados en las etapas de estimulación del sistema inmune y de acción efectora contra el Ag viral infeccioso. Las células encargadas de eliminar a este patógeno son los linfocitos B; el VFA es un Ag timo-independiente "optativo" (30, 112) mientras que el VFA inactivado, en las concentraciones en que se utilizan en las vacunas, es un Ag timo-dependiente típico, entonces si bien las células efectoras en la defensa contra el patógeno siguen siendo los linfocitos B, el animal inmunizado con el Ag inactivado (en bajas cantidades) necesita la estimulación del sistema T para montar una respuesta duradera y células B funcionalmente activas (141), lo que logramos con el agregado de avridine, PCM o LPS en las formulaciones vacunales. Tanto es así que linfocitos T estimulados 180 días antes con las vacunas experimentales (avridine, PCM y LPS) tienen la capacidad de estimular a linfocitos B primados contra el VFA pero insuficientes "per se" en la respuesta, dando como resultado la producción de AN (tablas 8 y 9).

Una vacuna óptima debe generar una población de linfocitos de memoria que produzca una respuesta protectora en el momento de la invasión del patógeno. Para lograrlo, la vacuna debe estimular un perfil de citoquinas, durante el proceso de inmunización, que genere la clase

apropiada de Acs y linfocitos de "memoria". En la protección contra agentes virales los niveles de Ac circulantes de la clase apropiada son de importancia crítica; las clases y niveles de Ac serán afectadas por el perfil de factores solubles regulatorios inducidos por la vacuna y por la reacción de las células de "memoria" frente a la exposición al patógeno. Es probable que adyuvantes que son bien conocidos por afectar la calidad y magnitud de las respuestas humoral y celular, lo hagan, en gran parte, afectando el perfil de factores reguladores producidos (162). La naturaleza del Ag también puede influir el patrón de citoquinas producidas. Datos previos dan evidencia de que la IL-1 y la IL-2, que estimulan las respuestas inmunes humoral y celular, juegan un papel importante en la acción adyuvante del LPS; es decir, el LPS induce la liberación de IL-1 y la producción de IL-2 se ve influida por la presencia de IL-1 (74, 124). Yoshimura y colaboradores (189) demostraron que la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana con LPS causa la liberación de IL-1 y actividad quimiotáctica. Esto podría ser una posible explicación para la acción del LPS utilizado en nuestro modelo. La IL-1 tiene una función inmunorreguladora, estimula la actividad de los linfocitos T y B, induciendo, entre otras, la capacidad de liberar IL-2 e IFN de las células T helper (185). El PCM puede activar monocitos y macrófagos causando la liberación de IL-1 (4). La IL-1 es un coadyuvante natural y consecuentemente amplifica inespecíficamente la respuesta inmune a células malignas y Ags (67). No hay datos acerca de la estimulación de producción de IL-1 por avridine pero estudios "in vivo" mostraron que la avridine estimula la migración de leucocitos hacia el sitio de inyección y la expansión de nódulos linfoides regionales. Observaciones de actividad proliferativa de linfocitos T y B sugieren que la avridine causa expansión de clones inmunorreactivos (8). Es posible pensar que estos mecanismos están mediados por factores regulatorios.

En el ratón se han identificado 4 isotipos de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (73, 92). Estos isotipos varían en sus propiedades bioquímicas y fisiológicas (41, 70). La subclase de IgG inducida por diferentes Ags virales es, entonces, importante cuando se consideran los mecanismos por medio de los cuales el Ag es neutralizado, así por ejemplo, la respuesta al

virus influenza es mediada predominantemente por IgG2a (96) mientras que la infección por HSV-1 (virus herpes simplex tipo 1) es abortada por IgG1 (118). No todos los isotipos son capaces de participar en la eliminación de complejos Ag-Ac de la sangre. En ratones esta propiedad está casi exclusivamente mediada por Acs IgG2 (105). El isotipo IgG2a ha sido reportado como especialmente protector en varias infecciones virales y bacterianas (101). El isotipo IgG2b fue menos estudiado pero también se ha determinado como Ac protector (118).

Estudios previos indican que las células T están involucradas en el aumento de respuestas de IgG2a a trinitrofenil Ficoll (125) y en el aumento de respuestas policlonales de IgG1 e IgG2 a LPS (117). Entonces podríamos relacionar la estimulación del sistema T con el incremento en los niveles de IgG1 e IgG2 que se observa luego de la vacunación con las diferentes formulaciones (figuras 10, 11, 12 y 13) y la mayor protección conferida.

Por su parte bovinos infectados o vacunados con virus inactivado respondieron predominantemente con IgG1 y resultaron protegidos contra el desafío, no así en el caso de ser inmunizados con péptidos de VP1, cuando la respuesta fue de IgG2 con capacidad protectora baja (130).

El bajo nivel de IgG3 es típico de la respuesta a varios virus (53) y es esperado ya que la IgG3 tiende a ser inducida preferencialmente por Ags timo-independientes (145). En nuestro modelo murino, donde el VFA activo se comporta como Ag timo-independiente "optativo", es marcado el aumento de IgG3 en respuesta a la infección (Pérez Filgueiras, comunicación personal). En general ninguna de las formulaciones ensayadas indujo producción de IgG3; la excepción fue PCM en vehículo oleoso, que 180 d.p.v. induce niveles bajos, pero detectables, de este isotipo (figura 13).

La inclusión de avridine en la vacuna oleosa no mostró efectos colaterales aún cuando fue notable la esplenomegalia producida en animales vacunados con esta formulación. El agregado de PCM o LPS a las vacunas acuosas no produjo efectos indeseables detectables. En

cambio el uso de PCM y LPS en la formulación oleosa produjo gran sensibilidad en las células esplénicas. Las células T no pudieron ser extraídas en forma viable para el estudio de transferencia de inmunidad a animales inmunodeprimidos. Tampoco se han podido realizar experimentos con células T provenientes de animales vacunados con la formulación oleosa clásica.

Experimentos preliminares indican que la vacunación de bovinos con formulaciones que incluyen avridine, LPS o PCM no inducen reacciones locales distinguibles de aquellas observadas luego de la vacunación con vacunas convencionales y los animales no se positivizan a la reacción de tuberculina (Sadir, comunicación personal).

Es necesario ensayar en bovinos vacunas antiaftosa conteniendo estos adyuvantes para evaluar la duración de inmunidad que inducen en esta especie. Si la respuesta de bovinos a avridine, LPS o PCM se asemejara a aquella observada en ratones sería posible vacunar anualmente para obtener una protección eficiente contra el VFA.

## VI. CONCLUSIONES

. - Las formulaciones vacunales contra el VFA que incluyen inmunomoduladores como avridine, LPS o PCM alargan el periodo de protección contra este patógeno con respecto a las vacunas convencionales. Aquellos animales inmunizados con las nuevas formulaciones resultan protegidos frente a la descarga viral 7 meses p.v. en el orden PCM oleoso > avridine > PCM hidróxido = LPS hidróxido > LPS oleoso.

. - La administración del Ag en emulsión oleosa o en hidróxido de aluminio sensibiliza a las células totales de bazo de los animales de manera tal que resultan capaces de transferir inmunidad 120 d.p.v. a receptores inmunodeprimidos; no así los linfocitos B, indicando que es necesaria la presencia de células T para la manifestación de respuesta secundaria de larga duración. Transcurridos 180 d.p.v. aún las células totales son incapaces de transferir inmunidad.

. - La presencia de avridine, LPS o PCM en las formulaciones activaría las poblaciones involucradas en la manifestación de respuesta secundaria por más de 5 meses p.v., permitiendo montar la respuesta efectora de las células B.

. - Los adyuvantes estudiados estimulan a los linfocitos T de forma tal que éstos cumplen su función helper 180 d.p.v. logrando estimular a linfocitos B primados contra el Ag, pero ineficientes "per se", para la producción de AN.

. - Tanto las formulaciones convencionales como las que contienen avridine, LPS o PCM, necesitan la presencia de células T maduras en los animales para ser efectivas ya que animales distímicos son incapaces de producir altos niveles de AN, si bien existe una respuesta apreciable el día 7 p.v., lo que se debe a la producción de IgM específicas.

. - Los inmunomoduladores ensayados estimulan la producción de los isotipos IgG1,2a y 2b.

## VII. RESUMEN

La Fiebre Aftosa es la enfermedad viral del ganado que mayor impacto económico ocasiona en Argentina, no sólo por los perjuicios directos sobre las especies afectadas, sino también por las pérdidas indirectas debido al cierre de mercados de exportación que representarían divisas para nuestro país.

El principal elemento utilizado en la lucha contra esta enfermedad es la inmunización preventiva, pero la principal limitante de los inmunógenos en uso es la corta duración de inmunidad que confieren.

En este trabajo se utilizó el modelo murino para estudiar el efecto de tres adyuvantes diferentes [avridine, extracto de pared celular de *Mycobacteria* (PCM) y lipopolisacárido de *Brucella ovis* (LPS)] en la respuesta a vacunas antiaftosa. Se examinó la duración de inmunidad conferida, el estado de protección viral 7 meses post-vacunación, las células inmunocompetentes estimuladas, involucradas en la respuesta secundaria de larga duración y los isotipos de IgG inducidos por los diferentes adyuvantes.

La incorporación de avridine, LPS o PCM en vacunas convencionales indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos potente y duradera. Los índices seroneutralizantes de animales vacunados con las nuevas formulaciones fueron significativamente mayores que los observados en animales inmunizados con vacunas convencionales y confirieron protección por lo menos durante 7 meses.


Los datos que surgen de los ensayos de reconstitución indican que los inmunomoduladores probados participan en la activación de las poblaciones celulares involucradas en la memoria de larga duración, lo que resulta en una respuesta secundaria de células B eficiente aún en ausencia de células T, si bien es imprescindible la presencia de linfocitos T para la acción primaria de estos adyuvantes. Los linfocitos T se ven estimulados de

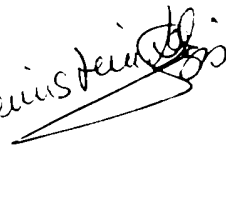
manera tal que adquieren la capacidad de estimular a linfocitos B primados contra el antígeno para la producción de anticuerpos.

Avridine, PCM y LPS estimulan la producción de IgG1, 2a y 2b, lo cual se encontraría relacionado con la protección conferida por las vacunas formuladas con estos inmunomoduladores.

No se detectaron reacciones adversas salvo en el caso del uso de vehículo oleoso con LPS y PCM que produjo una sensibilización de las células esplénicas por la cual no fue posible extraer células viables en estos caso 180 días post-vacunación.

Los efectos de avridine, LPS y PCM en la respuesta inmune a vacunas antiaftosa observadas en el modelo murino indican la posibilidad de su inclusión en vacunas para ser ensayadas en bovinos.



Amalia Baccus de...  


## VIII. BIBLIOGRAFIA

1.- ACHARYA, R.; Fry, E.; Stuart, D.; Fox, G.; Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The three dimensional structure of foot and mouth disease virus at 2,9 Å resolution. *Nature*, 337:709.

2.- AGTERBERG, M.; Adriaanse, H.; Lankhof, H.; Meloen, R. and Tommassen, J. (1990). Outer membrane PhoE protein of *E. coli* as a carrier for foreign antigenic determinants: immunogenicity of epitopes of foot and mouth disease virus. *Vaccine*, 8:85.

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

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

5.- 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 J. Knight Elsevier, Amsterdam.

6.- ALLISON, A. and Byars, N. (1986). An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods*, 95:157.

7.- ALLISON, A. and Davies, A. (1971). Requirement of thymus-dependent lymphocytes for potentiation by adjuvants of antibody formation. *Nature*, 233:330.

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

9.- ANDERSON, A. and Reynolds, J. (1979). Adjuvant effects of the lipid amine CP-20,961. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 26:667.

10.- ANDERSON, E.; Capstick, P.; Mowat, G. and Lech, F. (1970). "In vitro" method for safety testing for foot and mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 68:159.

11.- ANDERSON, E.; Masters, R. and Mowat, G. (1971). Immune response of pigs to inactivated foot and mouth disease vaccines. *Res. Vet. Sci.*, 12:342.



- 12.- 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.
- 13.- AUDIBERT, F.; Chedid, L.; Lefrancier, P. and Choay, J. (1976). Distinctive adjuvanticity of synthetic analogs of mycobacterial water-soluble components. *Cell Immunol.*, 21:243.
- 14.- AUGÉ 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.
- 15.- BACHRACH, H. (1968). Foot and mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97:659.
- 16.- 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.
- 17.- 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. *Intervirol.*, 12:65.
- 18.- BAHNEMANN, H. (1973). The inactivation of foot and mouth disease virus by ethylenimine and propylenimine. *Zbl. Vet. Med. B.*, 20:356.
- 19.- BAHNEMANN, H. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, 47:47.
- 20.- BARTELING, S. and de Leeuw, P. (1979). The use of stored concentrated antigens for the preparation of foot and mouth disease vaccines. *Res. Group. Eur. Comm. Contr. FMD. Lindblom, Denmark FAO, Rome*, pp 51.
- 21.- 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.
- 22.- BARTELING, S. and Vreeswijk, J. (1991). Developments in foot and mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9:75.

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

24.- 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.

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

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

27.- 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.

28.- BOMFORD, R. (1980). The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity II. Effect on delayed-type hypersensitivity in the mouse and guinea pig, and cell-mediated immunity to tumor antigens in the mouse of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, muramyl dipeptide and saponin. *Clin. Exp. Immunol.*, 39:435.

29.- 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.

30.- 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.

31.- 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.

32.- BROEKHUIJSEN, M.; Blom, T.; van Rijn, J.; Pouwels, P.; Klasen, E.; Fasbender, M. and Enger-Valk, B. (1986). Synthesis of fusion proteins with multiple copies of an antigenic determinant of foot and mouth disease virus. *Gene*, 49:189.

- 33.- BROEKHUIJSEN, M.; van Rijn, J.; Blom, A.; Pouwels, P.; Enger-Valk, B.; Brown, F. and Francis, M. (1987). Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot and mouth disease virus protect both natural host and laboratory animals. *J. Gen. Virol.*, 68:3137.
- 34.- 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.
- 35.- BROWN, F.; Cartwright, B. and Steward, D. (1963). The effect of various inactivating agents on the viral and the ribonucleic acid infectivities of foot and mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells. *J. Gen. Microbiol.*, 31:179.
- 36.- 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.
- 37.- BROWN, F.; Hyslop, N.; Crick, J. and Morrow, A. (1963). The use of acetyl-ethylenimine in the production of inactivated foot and mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 61:337.
- 38.- BRUNER, D.; Gillespie, J. (1966). In: Hagen's Infectious Diseases of Domestic Animals, Chp. 44:791. Cornell Univ. Press Ithaca, N. Y.
- 39.- 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.
- 40.- BURROWS, R. (1968). Excretion of foot and mouth disease virus prior to the development of lesions. *Vet. Res.*, 82:387.
- 41.- BURTON, D.(1985). Review: Immunoglobulin G, functional sites. *Molec. Immunol.*, 22:161.
- 42.- BYARS, N. and Allison, A. (1987). Adjuvant formulation for use in vaccines to elicit both cell-mediated and humoral immunity. *Vaccine*, 5:223.
- 43.- 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.

44. - CARRILLO, E.; Giachetti, C. and Campos, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot and mouth disease virus replication. *Virology*, 135:542.
45. - CENTRO Panamericano de Fiebre Aftosa. Banco de Datos. 1972-1981.
46. - CLARKE, B.; Newton, S.; Carroll, A.; Francis, M.; Appleyard, G.; Syred, A.; Highfield, P.; Rowlands, D. and Brown, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to Hepatitis B core protein. *Nature*, 330:381.
47. - COLLEN, T.; Mc Cullough, K. and Doel, T. (1984). Induction of antibodies to foot and mouth disease virus in presensitized mouse spleen cultures. *J. Virol.*, 52:650.
48. - COLTER, J.; Bird, H. and Brown, F. (1957). Infectivity of ribonucleic acid from ehrlich ascites tumor cells infected with mengoencephalitic. *Nature*, 179:859.
49. - COON, J. and Hunter, R. (1975). Properties of conjugated protein immunogens which selectively stimulate delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*, 114:1518.
50. - 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. *Intervirology*, 10:165.
51. - 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.
52. - 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.
53. - COUTELIER, J.; van der Logt, J.; Heessen, F.; Warnier, G. and van Snick, J. (1987). IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.*, 165:64.
54. - COWAN, K. (1968). Immunochemical studies of foot and mouth disease IV. Preparation and evaluation of antisera specific for virus, virus protein subunit and the infection associated antigen. *J. Immunol.*, 109:1183.

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

56.- CUNHA, R.; Junior, J.; Serraro, W. and Torruela, I. (1957). El uso de ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significancia inmunológica. *Gac. Vet.*, 110:243.

57.- CUNLIFFE, H. (1964). Observations on the duration of immunity in cattle after experimental infection with foot and mouth disease virus. *Cornell Veterinary*, 54:501.

58.- 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.

59.- CHEDID, L.; Parant, M.; Audibert, F.; Riveau, G.; Parant, F.; Lederer, E.; Choay, J. and Lefrancier, P. (1982). Biological activity of a new synthetic muramyl dipeptide adjuvant devoid of pyrogenicity. *Infect. Immun.*, 35:417.

60.- CHEUNG, A. and Küpper, H. (1984). Biotechnological approach to a new foot and mouth disease virus vaccine. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.*, 1:223.

61.- CHILLER, J.; Skidmore, B.; Morrison, D. and Weigle, W. (1983). Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharide to its function in mitogenesis and adjuvanticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70:2129.

62.- DAVIES, P. and Allison, A. (1976). Secretion of macrophage enzymes in relation to the pathogenesis of chronic inflammation. In: *Immunobiology of the Macrophage*. Nelson ed. pp.427. Academic Press, New York.

63.- DE CASTRO, M. (1964). Behavior of foot and mouth disease virus in cell cultures: susceptibility of the IB-BR-2 cell line. *Arg. Inst. Biol.*, 31:63.

64.- 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.

65.- DIAMOND, L. (1974). Two spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo culture. *Int. J. Cancer*, 2:143.

66.- 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.

67.- DINARELLO, C. (1988). Biology of Interleukin 1. *Faseb J.*, 2:108.

68.- 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.

69.- DOMINGO, E.; Mateu, G.; Martínez, M.; Dopazo, J.; Moya, A. and Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot and mouth disease virus. In: E. Kurstak, R. Marusyk, F. Murphy and M. Van Regenmortel (eds.) *Applied Virology Research. Vol. II.*

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

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

72.- 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.

73.- FAHEY, J.; Wunderlich, J. and Mishell, R. (1964). The immunoglobulins of mice: 7S gamma 2, 7S gamma 1, gamma 1A ( $\beta$ 2A), and 18S gamma 1 M-globulins. *J. Exp. Med.*, 120:223.

74.- FARRAR, J.; Mizel, S.; Fuller-Bonar, J.; Hilfiker, M. and Farrar, W. (1980). Lipopolysaccharide-mediated adjuvanticity: Effect of lipopolysaccharide on the production of T-cell growth factor (interleukin 2). In: D. Schlesinger (ed.), *Microbiology-1980*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 36.

75.- FAVRE, H.; Mougeot, H.; Fargeaud, D.; Brun, A.; Dubouclard, C. and Fontaine, J. (1975). Utilisation d'une lignée cellulaire adaptée a la culture en suspension pour la préparation des vaccins anti-aphteux. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 81:1201.

76.- 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.

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

78.- FONG, S. and Doyle, M. (1986). Response of bovine and porcine peripheral blood mononuclear cells to human recombinant interleukine 212s. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, 11:91.

79.- 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.

80.- FRACASTORIUS, H. (1546). *De contagione et contagiosis morbis et curatione*. BK. I, chp. 12, Venecia.

81.- FRANCIS, M.; Fry, C.; Rowlands, D.; Bittle, J.; Houghten, R., Lerner, R. and Brown, F. (1987). Immune response to uncoupled peptides of foot and mouth disease virus. *Immunology*, 61:1.

82.- 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.

83.- 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.

84.- FRENKEL, S.; Barendregt, L.; Kloosterman, E. and Talmon, F. (1982). Serological response of calves to aluminum hydroxide gel FMD vaccine with or without saponin. Influence of genetic differences on this response. *OIE, Proc. 16th Conf. on FMD, Paris*, pp. 14.

85.- FREUND, J. and Thompson, K. (1945). A simple rapid technique of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologicals. *Science*, 101:468.

86.- FROST, P. and Lance, E. (1973). The relation of lymphocyte trapping to the mode of action of adjuvants. In: *Immunopotential*, CIBA Foundation Symposium N° 18, pp. 29. Ed. G.E.W. Wolstenholme and J. Knight Elsevier, Amsterdam.

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

88.- 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.

89.- GERY, I.; Kruger, J. and Spiesel, S. (1972). Stimulation of B lymphocytes by endotoxin. Reaction of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T6T6 thymus grafts. *J. Immunol.*, 108:1088.

90.- GIRARD, H. and Mackowiak, C. (1953). La culture du virus aphteux au stade industriel. *Rev. d'Immunol.*, 17:224.

91.- GLENNY, A.; Buttle, G. and Stevens, M. (1931). Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 34:267.

92.- GREY, H.; Hirst, J. and Cohn, M. (1971). A new mouse immunoglobulin: IgG3. *J. Exp. Med.*, 133:289.

93.- 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.

94.- HADDEN, J. (1979). The immunopharmacology of immunotherapy. *Springer Seminars in Immunophatology*, 2:35.

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

96.- HOCART, M.; Mackenzie, J. and Stewart, G. (1988). The IgG subclass response induced by wild-type, cold-adapted and purified haemagglutinin from influenza virus A/Queensland/6/72 in CBA/CaH mice. *J. Gen. Virol.*, 69:1873.

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

98.- JOLLES, P. and Paraf, A. (1973). Mechanism of adjuvants activity. In: *Chemical and Biological Basis of Adjuvants: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Vol. 13 pp. 81, eds. A. Kleinzeller, G. Springer and H. Wittman, Springer Verlag, Berlin.



- 99.- KAMINSKI, M.; Kitamura, K.; Maloney, D.; Campbell, M. and Levy, R. (1986). Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotypic therapy of murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class-switch variants. *J. Immunol.*, 136:1123.
- 100.- KARCH, H. and Nixdorff, K. (1983). Modulation of the IgG subclass responses to lipopolysaccharide by bacterial membrane components: differential adjuvant effects produced by primary and secondary stimulation. *J. Immunol.*, 131:6.
- 101.- KENNEY, J.; Hughes, B.; Masada, M. and Allison, A. (1989). Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods*, 121:157.
- 102.- KITAMURA, N.; Sembler, B.; Rothberg, P.; Larsen, G.; Adler, C.; Dörner, 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.
- 103.- KITSON, J.; Burke, K.; Pullen, L.; Belsham, G. and Almond, J. (1991). Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot and mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs. *J. Virol.*, 65:3068.
- 104.- KITSON, J.; McCahon, D. and Belsham, G. (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.
- 105.- KLAUS, G.; Pepys, M.; Kitajima, K. and Askonas, B. (1979). Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology*, 38:687.
- 106.- 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 Commission, Paris, pp.179.
- 107.- KNUDSEN, R.; Grocock, C. and Andersen, A. (1979). Immunity to foot and mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune response. *Infect. Immunol.*, 24:787.
- 108.- KUPPER, H.; Ketter, W.; Kurz, C.; Forss, S.; Schaller, H.; Franze, R.; Strohmaier, K.; Marquardt, D.; Zaslarky, V. and Hofschneider, P. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature*, 289:555.

109.- LASCELLES, A.; Eagleson, G.; Beh, 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.

110.- LEONG, D.; Diaz, R.; Milner, K.; Rudbach, J. and Wilson, J. (1970). Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect. Immun.*, 1:174.

111.- LOEFFLER, F. and Frosch, P. (1897). *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I, Origin*, 22:257.

112.- 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.

113.- LOVGREN, K.; Lindmark, J.; Pipkorn, R. and Morein, B. (1987). Antigenic presentation of small molecules and peptides conjugated to a preformed iscom as carrier. *J. Immunol. Methods*, 93:137.

114.- MATTHEWS, R. (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17:1.

115.- McCAULEY, E.; Aulaqi, 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.

116.- McGHEE, J.; Farrar, J.; Michalek, S.; Mergenhagen, S. and Rosenstreich, D. (1979). Cellular requirements for lipopolysaccharide adjuvanticity. A role for both T lymphocytes and macrophages for in vitro responses to particulate antigens. *J. Exp. Med.*, 149:793.

117.- McKEARN, J.; Paslay, J.; Slack, J.; Baum, C. and Davie, J. (1982). B cell subsets and differential responses to mitogens. *Immunol. Rev.*, 64:5.

118.- McKENDALL, R. and Woo, W. (1988). Murine IgG subclass responses to Herpes simplex virus type 1 and polypeptides. *J. Gen. Virol.*, 69:847.

119.- McKERCHER, P. and Farris Jr., H. (1967). Foot and mouth disease in swine: Response to inactivated vaccines. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 22:451.

120.- McKERCHER, P. and Gailiunas, P. (1969). Response of swine to inactivated foot and mouth disease vaccines. Duration of immunity and local tissue reactions. Arch. Ges. Virusforsch. , 28:165.

121.- McKERCHER, P. and Graves, J. (1977). A review of the current status of oil adjuvants in foot and mouth disease vaccines. Dev. Biol. Stand. , 35:107.

122.- MELOEN, R.; Puyk, R.; Meijer, D.; Lankhof, H.; Posthumus, W. and Scaaper, W. (1986). The use of peptides to locate epitopes on the surface of foot and mouth disease virus. Immunol. Topics, 4:103.

123.- MICHELSEN, E. (1961). Experience with vaccination of pigs. Arch. Exp. Vet. Med. , 15:317.

124.- MIZEL, S. (1980). Lymphocyte-activating factor (interleukin 1), a possible mediator of endotoxin adjuvancy. In: D. Schlesinger (ed.), Microbiology-1980, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 40.

125.- MONGINI, P.; Paul, W. and Metcalf, E. (1982). T cell regulation of immunoglobulin class expression in the antibody response to trinitrophenyl-ficoll. Evidence for T cell enhancement of the immunoglobulin class switch. J. Exp. Med. , 155:884.

126.- MORENO, E.; Kurtz, R. and Berman, D. (1984). Induction of immune and adjuvant immunoglobulin G responses in mice by *Brucella* Lipopolysaccharide. Infec. Immun. , 46:74.

127.- MORGAN, D.; McKercher, P. and Bachrach, H. (1970). Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified foot and mouth disease virus vaccine for swine and steers. Appl. Microbiol. , 20:770.

128.- 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.

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

130.- MULCAHY, G.; Gale, C.; Robertson, P.; Iyisan, S.; DiMarchi, R. and Doel, T. (1990). Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to foot and mouth disease virus. *Vaccine*, 8:248.

131.- NAGAO, S. and Tanaka, A. (1980). Muramyl dipeptide-induced adjuvant arthritis. *Infect. Immun.*, 28:624.

132.- NAKASHIMA, I.; Nagase, F.; Matsuura, A. and Kato, N. (1980). Adjuvant actions of polyclonal lymphocyte activators II. Comparison and characterization of their actions in initiation and potentiation of immune responses to T-dependent and T-independent soluble antigens. *Cell Immunol.*, 49:360.

133.- NATHANS, I. (1965). Vaccinatie van varkens tegen mond-en Klauwzeer met geïnactiveerd virus bevattende entstoffen. Thesis, Utrecht.

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

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

136.- OPPENHEIM, J.; Togawa, A.; Chedid, L. and Mizel, S. (1980). Components of Mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor. *Cell Immunol.*, 50:71.

137.- PARRY, N.; Ouldrige, E.; Barnett, P.; Rowlands, D.; Brown, F.; Bittle, J.; Houghten, R. and Lerner, R. (1985). Identification of neutralizing epitopes of foot and mouth disease virus. In: *Vaccines: Molecular and Chemical Basis of Resistance to Parasitic, Bacterial and Viral Diseases*. NY Cold Spring Harbor Laboratory 85:211.

138.- PEREIRA, H. (1981). Foot and mouth disease. *Virus diseases of food animals*. E. Gibbs (ed.) Vol. 2 pp. 33, Academic press.

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

- 140.- PFAFF, E.; Mussgay, M.; Boehm, H.; Schultz, G. and Schaller, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. *Eur. Mol. Biol. J.*, 1:869.
- 141.- 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.
- 142.- PLOWRIGHT, W. and Ferris, R. (1961). The preparation of bovine thyroid monolayers for use in virological investigations. *Res. Vet. Sci.*, 2:149.
- 143.- 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.
- 144.- PRINGLE, C. (1964). Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot and mouth disease virus strains. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 61:619.
- 145.- RADBRUCH, A.; Burger, C.; Klein, S. and Müller, W. (1986). Control of immunoglobulin class switch recombination. *Immunol. Reviews*, 89:69.
- 146.- RAMON, G. (1926). Procédès pour accroite la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur*, 40:1.
- 147.- RIBI, E.; Ulrich, J. and Masihi, K. (1987). Immunopotentiating activities of monophosphoryl lipid A. In: *Immunopharmacology of Infectious Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-specific Resistance*, Majde, J. ed. pp. 101. Alan, R. Liss, NY.
- 148.- RIVENSON, S.; Sadir, A.; Gaggino, O.; Marcovecchio, F.; Zabal, O.; Laporte, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidróxisaponinada. *Rev. Med. (Bs. As.)*, 63:364.
- 149.- ROSENBUSCH, C. (1960). Eficacia comparativa de vacunas antiaftosa elaboradas con virus cultivado y epitelio lingual bovino. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)*, 41:155.
- 150.- 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.

151.- 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.

152.- RUECKERT, R. (1976). On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In: *Comprehensive Virology Vol. I* pp. 131. Edited by H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, N.Y., Plenum press.

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

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

155.- RWEYEMAMU, M.; Umehara, O.; Medeiros Neto, R. and Schiappacassi, C. (1985). Avridine: a new synthetic adjuvant for veterinary vaccines. X<sup>2</sup> Congreso Panamericano de Veterinaria y Zootecnia. V<sup>2</sup> Congreso Argentino de Cs. Veterinarias, Bs. As. Argentina.

156.- 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*. 2<sup>a</sup> Conferencia Internacional pp. 91, Mar del Plata, Argentina.

157.- SANGAR, D. (1979). The replication of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 45:1.

158.- SANGAR, D.; Harris, J. and Brown, F. (1977). A protein covalently linked to foot and mouth disease virus RNA. *Nature*, 268:648.

159.- SCHUDEL, A.; Sadir, A. (1986). Fiebre Aftosa. *Adel. Microbiol. Enf. Infec.*, 5:22.

160.- SELLERS, R. (1971). Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.*, 41:431.

161.- SEMLER, B.; Anderson, C.; Kitamura, N.; Rothkerg, 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.

162. - SEWELL, W.; De Moerloose, P.; Hamilton, J.; Schrader, J.; Mackay, I. and Vadas, M. (1987). Potentiation of delayed hypersensitivity by pertussigen and cyclophosphamide with release of different lymphokines. *Immunology*, 61:483.

163. - SHAHAN, M. (1962). The virus of foot and mouth disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 101:444.

164. - SKINNER, H. (1953). One week old white mice as test animals in foot and mouth disease research. *Proc. XVth. Int. Cong. Stockholm*, 1:195.

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

166. - STOURAITIS, P.; Ozawa, Y. and Moussa, A. (1975). Susceptibility of hamster lung (HmLu) line to foot and mouth disease virus. *Res. Gr. Eur. Comm. Control FMD, Brescia, Italy, FAO, Rome*, pp. 54.

167. - STROHMAIER, K.; Franze, R. and Adam, K. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J. Gen. Virol.*, 59:295.

168. - 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.

169. - 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.

170. - TALBOT, P. and Brown, F. (1972). A model for foot and mouth disease. *J. Gen. Virol.*, 15:163.

171. - TALBOT, P.; Rowlands, D.; Burroughs, J.; Sangar, D. and Brown, F. (1973). Evidence for a group protein in foot and mouth disease particles. *J. Gen. Virol.*, 19:369.

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

173. - 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.
174. - VALLEE, H.; Carré, H. and Rinjard, P. (1926). Sur l'immunisation antiaphteuse par le virus formolé. *Rev. Gen. Med. Vet.*, 35:129.
175. - Van BEKKUM, J.; Bool, P. and Vermeulen, C. (1967). Experience with the vaccination of pigs for the control of foot and mouth disease in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 92:87.
176. - 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.
177. - VASANTHA, S.; Antony, A. and Lal, S. (1987). Liposome encapsulated subunit (VP1) and virion vaccines against foot and mouth disease. *Acta Virologica*, 31:109.
178. - WALDMANN, D.; Kobe, K. and Pyl, G. (1937). Die aktive immunisierung des Rindes gegen Maul-und Klausenseuche. *Zbl. Bakteriol. J. Orig.*, 138:401.
179. - WARDLEY, R.; Chapman, N. and Garland, A. (1979). A blastogenic test for foot and mouth disease. *J. Hyg.*, 83:507.
180. - WARREN, H.; Vogel, f. and Chedid, L. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.*, 4:369.
181. - WATERS, R.; Terrell, T. and Jones, G. (1986). Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. *Infect. Immun.*, 51:816.
182. - WECHSLER, D. and Konghshavn, P. (1986). Heat-labile antibodies effect cure of *Trypanosoma musculi* infection in C57BL/6 mice. *J. Immun.*, 137:2968.
183. - WIESMÜLLER, K.; Jung, G. and Hes, G. (1989). Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot and mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine*, 7:29.
184. - WILD, T.; Burroughs, J. and Brown, F. (1969). Surface structure of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 4:313.



185. - WINTERS, W. and Harris, S. (1982). Interferon induction in healthy and tumor-bearing dogs by cell walls of *Mycobacterium bovis* strain bacille Calmette-Guerin. Am. J. Vet. Res. , 43:1232.

186. - 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.

187. - WITTMANN, G. (1972). Versuche zur Revakzinierung von Schweinen mit einer Athylathylenimin (EEI)/DEAE-Dextran-Vakzine gegen Maulund-Klavenseuche. Zbl. Vet. Med. B., 19:45.

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

189. - YOSHIMURA, T.; Matsushima, K.; Oppenheim, J. and Leonard, E. (1987). Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). J. Immunol., 139:788.

190. - ZIEGLER, H.; Staffileno, L.; Wentworth, P. (1984). Modulation of macrophage Ia-expression by lipopolysaccharide. I. Induction of Ia expression "in vivo". J. Immunol., 133:1825.