



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA *in vitro*
E *in vivo* DE LA GLICOPROTEÍNA J
DEL VIRUS DE LARINGOTRAQUEITIS
INFECCIOSA AVIAR EXPRESADA EN
LA ENVOLTURA VIRAL DE
BACULOVIRUS**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN**

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

SANDRA STEFFANY MORALES RUIZ

LIMA – PERÚ

2018

Asesor Interno:

Mirko Zimic Peralta PhD.

Asesor Externo:

Manolo Clemente Fernández Díaz M.V. MSc.

Agradecimientos

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (InnovatePerú) del Ministerio de la Producción por financiar el presente trabajo de investigación.

A Manolo Fernández Díaz M.V. MSc. por su asesoramiento y permitir mi participación en este trabajo de investigación mediante el desarrollo de la presente tesis.

A Mirko Zimic Peralta PhD. por sus sugerencias y asesoramiento a lo largo de la presente tesis

A la empresa Farmacológicos Veterinarios S.A.C. por el financiamiento brindado para realizar mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Farmacológicos Veterinarios S.A.C. por facilitarme el uso de sus instalaciones para la realización de la presente tesis.

De manera especial a MSc. Jorge Bendezú por su paciencia y compañía a lo largo de este reto.

A mi familia por su apoyo incondicional y a mis queridos sobrinos Fabrizio y Joaquin por alegrar mis días con sus ocurrencias y sus risas.

Fuentes de Financiamiento

La presente tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (InnovatePerú) del Ministerio de la Producción del Perú a través del trabajo de investigación con Convenio 007-FINCyT-FIDECOM-PIPEI-2014.

Los estudios de maestría fueron financiados por la empresa Farmacológicos Veterinarios S.A.C.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Lista de Tablas | i |
| Lista de Figuras | ii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| ABSTRACT | v |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Generalidades | 1 |
| 2. El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar | 3 |
| 3. Replicación del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar..... | 4 |
| 4. Patología de la enfermedad causada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar | 5 |
| 5. Genoma viral del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar..... | 6 |
| 6. Glicoproteínas del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar | 7 |
| 7. Inmunología aviar contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar: respuesta humoral y respuesta mediada por células | 9 |
| 8. Desarrollo de vacunas aviares contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar y la necesidad por la implementación de nuevas estrategias para el desarrollo de éstas. Baculovirus: vehículo presentador de antígenos heterólogos..... | 12 |
| PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | 22 |
| JUSTIFICACIÓN | 24 |
| HIPÓTESIS..... | 26 |
| OBJETIVO GENERAL | 27 |
| OBJETIVO ESPECÍFICOS..... | 27 |
| DISEÑO DEL ESTUDIO | 28 |
| METODOLOGÍA | 29 |
| 1. Componente: Bioinformático..... | 29 |
| 1.1 Construcción del mapa del vector in sílico..... | 29 |
| 1.2 Obtención de secuencia de ADN ensamblado in sílico | 30 |

| | |
|---|----|
| 2. Componente: Sistema de expresión de proteínas en células de insecto (baculovirus)..... | 31 |
| 2.1 Preparación de células químicamente competentes <i>Echerichia coli</i> (<i>E. coli</i>) cepa DH5-alfa y DH10BacVSV..... | 31 |
| 2.3 Purificación del plásmido “Ch-gpJ” | 33 |
| 2.4 Transformación/Transposición del plásmido “Ch-gpJ” en células competentes DH10BacVSV de <i>E. coli</i> | 33 |
| 2.5 Transfección de células de insecto (Sf9) con el “bácmido - Ch-gpJ” recombinante..... | 35 |
| 2.6 Amplificación viral del baculovirus “Ch-Bv-gpJ” recombinante..... | 36 |
| 2.7 Titulación viral por ensayo de placa. | 36 |
| 2.8 Concentración de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”..... | 39 |
| 2.9 Expresión de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en células de insecto (Sf9)..... | 40 |
| 3. Componente: Ensayos serológicos e inmunológicos | 46 |
| 3.1 Ensayo de Sero-neutralización del baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” | 46 |
| 3.2 Evaluación <i>in vitro</i> de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” | 48 |
| 4. Componente: Inmunización y desafío..... | 51 |
| 4.1 Ensayo experimental de TCID50 para determinar la dosis infectiva media en cultivo celular para una cepa de campo de ILTV..... | 51 |
| 4.2 Ensayo de inmunización y desafío en aves..... | 51 |
| 4.3 Evaluaciones de signos clínicos, moleculares, serológicas e inmunológicas..... | 53 |
| 4.4 Datos estadístico | 57 |
| RESULTADOS..... | 59 |
| 1. Componente: Bioinformático..... | 59 |
| 2. Componente: Sistema de expresión de proteínas en células de insecto (baculovirus)..... | 61 |
| 3. Componente: Ensayos serológicos e inmunológicos | 69 |
| 4. Componente: Inmunización y desafío..... | 73 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| DISCUSIÓN | 86 |
| CONCLUSIONES | 100 |
| RECOMENDACIONES | 101 |
| REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA | 102 |
| ANEXO | |

Lista de Tablas

Tabla 1. Grupos de aves para ensayo de inmunización y desafío (Pág. 51)

Tabla 2. Descripción de eventos para ensayo de inmunización y desafío. (Pág. 52)

Tabla 3. Puntaje de signos clínicos evaluados en días posteriores al desafío. (Pág. 76)

Tabla 4. Evaluación de la carga viral en tejido traqueal en días posteriores al desafío.
(Pág. 79)

Tabla 5. Evaluación del título de anticuerpos en los días después de la inmunización y después del desafío. (Pág. 83)

Tabla 6. Evaluación de la relación CD4/CD8 en los días después de la inmunización y después del desafío. (Pág. 84)

Tabla A1. Referencia de genes de inserto (Bv-gpJ) (ANEXO)

Tabla A2. Secuencia nucleotídica de genes del inserto (Bv-gpJ). (ANEXO)

Tabla A3. Secuencia del plásmido donador pACEMam1. (ANEXO)

Tabla A4. Características del plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza).
(ANEXO)

Tabla A5. Cuantificación de chIL12 (pg/mL) por ELISA en formato sándwich.
(ANEXO)

Tabla A6. Evaluación de signos clínicos, carga viral, título de anticuerpos y relación CD4/CD8. (ANEXO)

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del diseño del estudio. (Pág. 28)

Figura 2. Esquema del Ensamblado del inserto “Bv-gpJ”. (Pág. 29)

Figura 3. Mapa del plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza). (Pág. 30)

Figura 4. Esquema de trabajo con el sistema de expresión de proteínas en célula de insecto (baculovirus). (Pág. 39)

Figura 5. Secuencia “Bv-gpJ” ensamblada *in silico* comprende secuencias del péptido señal (SP) de gp64, DsRed2, dominio transmembrana de gp64 y 6x-histidina (peso molecular aproximado 195.7KDa). (Pág. 59)

Figura 6. Inserción del fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ” en el plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza). (Pág. 60)

Figura 7. Obtención de “Ch-gpJ” mediante la inserción del fragmento 2 en el plásmido donador que contiene el fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ”. (Pág. 60)

Figura 8. Digestión de plásmido recombinante “Ch-gpJ” con enzimas de restricción XbaI y SmaI. 1-8: plásmidos digeridos. 9: plásmido no digerido. 10: marcador de peso molecular LambdaDNA/HindIII. (Pág. 61)

Figura 9. Placa LB agar que contiene colonias recombinantes de color blanco “bácmido-Ch-gpJ”. (Pág. 62)

Figura 10. Secuenciamiento de 1050 pb perteneciente al gen que codifica gpJ. A: secuenciamiento utilizando el cebador forward. B: utilizando el cebador reverse. (Pág. 62)

Figura 11. Células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” (4dpi) detectadas mediante microscopia de fuorescencia. A: Células de insecto no infectadas (control negativo). B, C y D: células de insecto infectadas (4dpi). dpi: días pos-infección. (Pág. 63)

Figura 12. Detección mediante western blot de la cola de histidina (6x-histidina) presente en la secuencia “Ch-gpJ”. MOI: multiplicidad de la infección. dpi: días pos-infección. (Pág. 66)

Figura 13. Detección mediante western blot de gp64 presente en la secuencia “Ch-gpJ”. A: 24 horas pdi. B: 48 horas dpi. C: 72 horas pdi. D: 96 horas pdi. 1: marcador meolecular PAGE MASTER protein standard plus (Genscript, EE.UU). Baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”: 2: resto celular; 3: lisado celular; 4: sobrenadante. Baculovirus no recombinante: 5: resto celular; 6: lisado celular; 7: sobrenadante. dpi: días pos-infección. (Pág. 67)

Figura 14. Inmunofluorescencia directa para detección de 6xhis. Células de insecto infectadas con “Ch-Bv-gpJ”: (A) luz visible; (B) mCherry y DsRed2; (C) FITC; (D)

mCherry, DsRed2 y FITC. Células de insecto no infectadas (control negativo): (E) luz visible. (F) FITC. (Pág. 69)

Figura 15. Ensayo de seroneutralización en células de insecto infectadas a MOI de 0.1 de “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante utilizando sueros de aves infectadas con ILTV (A) y suero de aves SPF (B). IFR: intensidad de fluorescencia relativa. Las barras representan medianas. Kruskal-Wallis y Dunn test. (Pág. 71)

Figura 16. Detección de chIL12 por ensayo de ELISA mediante estimulación con Ch-Bv-gpJ y Baculovirus no recombinante. Las barras representan las medianas y sus rangos. Kruskal-Wallis y Dunn test. CpG ODN (control positivo) a 40µM. No estimulado con Ch-Bv-gpJ MOI 0.05 (p=0.0505), MOI 0.1 (p=0.0004) y MOI 0.2 (0.0006). 48 horas: No estimulado con Ch-Bv-gpJ: MOI 0.05 (p=0.0127), MOI 0.1 (p=0.0002) y MOI 0.2 (p=0.0005); con baculovirus no recombinante MOI 0.05 (p=0.0325), MOI 0.1 (p=0.0130) y MOI 0.2 (p=0.0023); con CpG (p=0.0007). 72 horas: No estimulado con Ch-Bv-gpJ MOI 0.1 (p=0.0073) y MOI 0.2 (p=0.0013); con baculovirus no recombinante MOI 0.1 (p=0.0465) y MOI 0.2 (p=0.0030). (Pág. 73)

Figura 17. Cinética de desarrollo de signos clínicos después del desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío. (Pág. 77)

Figura 18. Carga viral en tráquea evaluada los días posteriores al desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”;

Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío. (Pág. 80)

Figura 19. Relación CD4/CD8 en los días posteriores al desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío. dpi: días pos-inmunización; dpd: días pos-desafío. Las barras representan medias y desviación estándar. (Pág. 85)

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| USDA | Departamento de Agricultura de Estados Unidos |
| ILTV | Virus de laringotraqueitis infecciosa aviar |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| SPF | Libres de patógenos |
| UFP | Unidades formadoras de placa |
| SENASA | Servicio Nacional de Sanidad Animal |
| OIE | Organización Mundial de Sanidad Animal |
| GaHV-1 | Gallid herpesvirus de tipo 1 |
| Gp | Glicoproteína |
| EHV-1 y 4 | Herpesvirus de equino tipo 1 y 4 |
| HVS-1 | Herpesvirus simple de tipo 1 |
| HVT-LT | Herpesvirus de pavo-laringotraqueitis infecciosa aviar |
| DHT | Reacción de hipersensibilidad de tipo retardado |
| FPV-LT | Viruela aviar- laringotraqueitis infecciosa aviar |
| TLR | Receptores Toll-like |
| ODN | Oligodeoxinucleótidos |
| CMV | Citomegalovirus |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| TCID50 | Dosis infectiva media de tejido celular |
| SP | Péptido señal |
| TMD | Dominio transmembrana |
| 6x-his | Cola de histidine |
| <i>E. coli</i> | <i>Echerichia coli</i> |
| Medio LB | Medio Luria-Bertani |
| MOI | Multiplicidad de la infección |
| HRP | Peroxidase de rábano |
| DAB | 3,3'- Diaminobenzidina |

| | |
|----------|--|
| SDS-PAGE | Electrophoresis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| IFR | Intensidad de fluorescencia relative |
| TMB | 3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina |
| LMH | Células de hepatoma de pollo |
| PCR | Reacción en cadena de polimerasa |
| qPCR | PCR cuantitativo |
| CpG | Motivos CpG |
| chIL12 | Interleuquina 12 aviar |
| NK | Asesinos naturales |
| mARN | ARN mensajero |
| AND | Ácido desoxirribonucleico |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| TCO | Vacunas producidas en cultivo celular |
| CEO | Vacunas producidas en embrión de pollo |
| IBDV | Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa |
| IBV | Virus de bronquitis infecciosa aviar |

RESUMEN

La presencia del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) en la industria avícola peruana ha sido asociado a un incremento del 18% en la mortalidad de las aves ponedoras infectadas, así como a una disminución del 16% en la producción de huevos. El empleo de vacunas atenuadas contra ILTV ha sido asociado a brotes de infección en campo debido a que estos virus atenuados pueden recombinarse entre sí. En el presente trabajo se realizó la expresión de la glicoproteína J de ILTV en la envoltura viral de baculovirus (Ch-Bv-gpJ) el cual fue utilizado como un vehículo presentador del antígeno viral y como un potenciador de la respuesta inmune celular asociada a la inmunidad innata debido a sus propiedades como un agente adyuvante.

Para los ensayos de inmunización y desafío se utilizaron 6 grupos (n=10 aves SPF de 1 día de edad por grupo) que fueron distribuidos de la siguiente manera (A) 10^5 UFP/ave de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”; (B) 10^6 UFP/ave de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”; (C) 10^7 UFP/ave de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”; (D) 10^6 UFP/ave de baculovirus no recombinante; (E) grupo control no inmunizado ni desafiado y (F) grupo control sólo desafiado.

Los resultados demostraron que a pesar que no se detectó presencia de anticuerpos en suero de aves inmunizadas con 10^6 UFP de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” (grupo B) después del desafío, este grupo fue capaz de eliminar la replicación viral puesto que no se detectó carga viral en tráquea y se redujeron marcadamente las manifestaciones de los signos clínicos comparado con el grupo control sólo desafiado (grupo F). Esto demostró que el empleo de 10^6 UFP/ave de baculovirus recombinante

“Ch-Bv-gpJ” es la dosis óptima frente a infecciones del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. Sin embargo, más evaluaciones son necesarias para establecer el rol protectorio de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en condiciones de campo.

Palabras claves: ILTV, baculovirus, avicultura, vacuna, sistema inmune

ABSTRACT

Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in Peruvian poultry industry has been associated with 18% increased mortality in layer hens and 16% reduction of egg production. The use of live-attenuated vaccine against ILTV has been associated to infection outbreak in field due to attenuated viruses can recombine each other.

In the present work, we expressed the glycoprotein J of ILTV on the baculovirus envelop which has used as an antigen display vehicle and as an adjuvant to enhance the cell-mediated response associated with innate immunity. For immunization and challenge assays, we included six 1-day-old SPF chicken groups (n=10 SPF chickens per group) (A) 10^5 PFU/bird of “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus; (B) 10^6 PFU/bird of “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus; (C) 10^7 PFU/bird of “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus; (D) 10^6 PFU/bird of no recombinant baculovirus; (E) neither immunized nor challenged group; (F) only challenged group.

Despite the fact antibody titre was not detected in sera of immunized chicken with 10^6 PFU of “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus (B group) after challenge, this group was able to significantly eliminate viral replication due to no viral load was detected in trachea as well as it was observed a marked reduction of clinic signs in comparison with group F. It showed that 10^6 PFU of “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus is the optimal dose against ILTV infection. However, more evaluations are required to establish the immune protective role of 10^6 PFU “Ch-Bv-gpJ” recombinant baculovirus in field conditions.

Key words: ILTV, baculovirus, poultry, vaccine, immune system

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

1.1 Impacto económico del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV)

Las grandes pérdidas económicas en la actividad avícola están relacionadas a la presencia de enfermedades de tipo viral y bacteriano que afectan a pollos y por ende a la producción avícola limitando su desarrollo y generando probablemente desabastecimiento a la población mundial.

En 1925 se describió por primera vez al virus de laringotraqueitis infeccioso aviar como virus de “traqueolaringitis” proveniente de un brote de una granja en Rhode Island, Estados Unidos reportándose grandes pérdidas económicas debido al incremento en la mortalidad y reducción de la productividad (1). Posteriormente la presencia de este virus fue reportado en diferentes áreas avícolas no sólo de Estados Unidos sino también de Canadá en 1925 (2), Holanda en 1929 (3), Australia en 1935 (4), Suecia en 1940 (5), Polonia en 1948 (6), Finlandia en 1964 (7) entre otros (8).

En los últimos 30 años distintos brotes han sido reportados en diferentes áreas avícolas en todo el mundo. La presencia del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar fue reportado por primera vez en América del Sur en 1974 en Brasil (9) y en el 2002 se reportó un brote del virus de laringotraqueitis infecciosa en la región de Bastos en San Paulo, Brasil caracterizado por la

presencia de signos respiratorios así como el incremento en la mortalidad en gallinas ponedoras provenientes de 51 granjas (10). Asimismo, en noviembre del 2010 se produjo un gran brote del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en gallinas ponedoras de diferentes edades en el estado de Minas Gerais, Brasil que afectó a aproximadamente 8 millones de aves agrupadas en núcleos de 100 000 a 2 900 000 aves causando una mortalidad promedio de 1-6% y una morbilidad de 90% (11).

A pesar que el Perú en 1996 fue considerado oficialmente por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como un país libre del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (12), el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) local reportó la detección de un caso de infección del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en aves de riña en el año 2008 y aplicó un plan para la prevención y erradicación de la laringotraqueitis infecciosa aviar mediante Resolución Jefatural N° 386-2008-AG-SENASA (13). Actualmente el SENASA reporta de forma obligatoria y semanal los casos presuntivos de infecciones asociadas a el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar de los cuales sólo analiza una muestra representativa y registra los resultados de dicha evaluación y el número de aves susceptibles a la enfermedad (14).

Estudios publicados en revistas científicas locales sobre el impacto económico del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en el Perú han reportado disminución del 16% en la producción de huevos, así como un incremento del 18% en la mortalidad de las ponedoras infectadas (15). Otro

estudio comparativo en la presencia y ausencia del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en 35 mil pollos de engorde criados hasta los 49 días de edad reveló un incremento en la mortalidad de 3.51% y una reducción de la eficiencia productiva de 27.3% dando como resultado pérdidas totales que ascienden a S/. 88 805 nuevos soles por lote de aves (16).

Por lo cual, el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar representa un gran problema para la actividad avícola en el Perú y por ende a la población peruana dedicada a esta actividad como medio de trabajo.

2. El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

2.1 Etiología

Clasificación

El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV, siglas en inglés) es un Gallid herpesvirus de tipo I (GaHV-1) miembro del género *Iltovirus*, subfamilia *alphaherpesviridae* de la familia *Herpesviridae* del orden *Herpesvirales* (17).

2.2 Morfología

Se detectó en cultivo celular de embriones de pollo que las nucleocapsides del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar presentan partículas virales con simetría icosaédrica. La nucleocapside de forma hexagonal mide entre 80-100 nm de diámetro y está compuesta de 162 capsómeros huecos alargados. La partícula viral completa consiste de una envoltura viral

alrededor de la nucleocapside la cual tiene un diámetro entre 195-250 nm y presenta proyecciones superficiales finas conocidas como glicoproteínas (18, 19).

3. Replicación del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar presenta formas características de penetración y salida de las células infectadas que se conservan en todos los herpesvirus. La penetración del virus a la célula blanco se da por fusión directa de la envoltura viral y la membrana celular. La nucleocapside desnuda llega a los poros del núcleo a través del movimiento de los microtúbulos celulares donde el genoma viral es liberado en el núcleo.

La formación de las nuevas partículas virales empieza con el ensamblaje de sus nucleocapsides en el núcleo, desde donde salen al citoplasma mediante gemación a través de la membrana interna nuclear, en donde adquiere una envoltura primaria, hacia el espacio perinuclear. Esta envoltura primaria posteriormente permite la fusión de la nucleocapside con la membrana externa del núcleo hacia el citoplasma adquiriendo aparentemente una segunda envoltura con alto contenido de tegumento resultando en partículas virales con envoltura localizadas en vesículas derivadas del aparato de Golgi para ser finalmente liberadas de la célula (20, 21).

La transcripción y replicación viral de los herpesvirus se realiza en el núcleo de la célula hospedera. El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar al igual que otros herpesvirus presenta 3 clases de genes los cuales han sido clasificados

según el intervalo de tiempo en el cual se encuentran activos o expresados. Genes inmediatamente tempranos (IE) agrupan genes que codifican factores de transcripción. Genes tempranos (E) agrupan genes que participan en el metabolismo y replicación viral. Genes tardíos (L) agrupan genes que codifican proteínas que participan en el ensamblaje viral (22, 23).

4. Patología de la enfermedad causada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

El órgano blanco principal para el desarrollo de la infección causada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar es el tracto respiratorio. El tejido epitelial de la tráquea como la laringe son los tejidos de preferencia que se ven afectados siendo en menor proporción las membranas mucosas como la conjuntiva, sacos aéreos y el tejido pulmonar.

La replicación activa del virus ocurre sólo durante la primera semana la cual puede extenderse hasta 10 días después de la infección. Usualmente los pollos infectados logran recuperarse dentro de los 7 a 10 días después de la primera manifestación de los signos clínicos, este periodo coincide con la replicación activa del virus a nivel de tráquea. Desde el día 10 hasta las 4 semanas después de haber ocurrido la infección en tráquea el virus entra en fase de latencia invadiendo los tejidos nerviosos y estableciéndose en el ganglio trigémino. La reactivación del virus puede darse como resultados de situaciones de estrés como comienzo de postura, cambios en temperatura entre otros (24).

El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar se transmite naturalmente mediante el tracto respiratorio superior, vía aérea y ocular; siendo las fuentes de transmisión: las aves clínicamente infectadas, animales portadores, polvo contaminado, escarabajos, agua y desechos de aves (25).

Esta enfermedad se caracteriza por el hallazgo de sangre, restos mucosos y exudados amarillos caseosos en la tráquea que conllevan a la muerte por asfixia. La forma sub-aguda de la enfermedad está caracterizada por presentar zonas hemorrágicas en la tráquea, edemas y congestión en el epitelio de la conjuntiva así también en los senos infraorbitarios. Además de signos clínicos generales como congestión nasal y ocular, tos, jadeos, estornudos, expectoración de sangre y sustancias mucosas (24, 26).

5. Genoma viral del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

El material genético del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar es un ADN lineal de doble cadena del tipo herpesvirus D que está compuesta de una región larga única (UL) y una región corta única (US) que presenta dos orientaciones isoméricas (27) asimismo la región única corta está flanqueada por una secuencia repetitiva idéntica interna y terminal (28).

El primer genoma completamente secuenciado fue de la cepa vacunal SERVA de 152 628 pares de bases con un contenido de guanina-citosina de 48% y 80 marcos de lectura abiertos (ORF, open reading frame) de los cuales 65 están localizados en la región UL, 9 en la región US y 3 en las secuencias repetitivas (29).

El orden de los genes dentro del genoma del virus es similar a otros alphaherpesvirus; sin embargo, cambios a nivel genómico propios de este virus y homólogos al Psittacid herpesvirus han sido identificados: translocación del ORF UL47 de la región UL a la US entre US3 y US4 (30); inversión interna en la región UL comprendida desde UL22 a UL44 (30) y la presencia de 5 ORFs (A, B, C, D y E) localizados al extremo 5' del gen UL45 (30, 31) así como la presencia de UL0 y UL-1 localizados en el extremo 5' de UL1 (32).

6. Glicoproteínas del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

6.1 Caracterización de las glicoproteínas virales

Como alphaherpesvirus, el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar presenta glicoproteínas en la envoltura viral que son inmunogénicas y los principales blancos de la respuesta inmune humoral y celular en el hospedero (33-35). Estudios previos realizados en herpes virus simple permitieron identificar glicoproteínas propias del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. Así se ha predecido que 12 glicoproteínas serían codificadas por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar, sin embargo de estas sólo algunas han sido estudiadas (36). La glicoproteína B es necesaria para la penetración del virus a la célula y está altamente conservada en los herpesvirus (37), la delección de la glicoproteína I y E está asociada a la incapacidad del virus de transmitirse de una célula a otra (38). Asimismo, la delección de la glicoproteína C está relacionada a un retraso en la penetración del virus a la célula observándose una reducción en el

diámetro de las placas formadas (36). La glicoproteína secretada G está asociada a la evasión viral del sistema inmune del hospedero debido a que esta interactúa y bloquea a las quimioquinas (39).

6.2 Glicoproteína J

A pesar que los estudios realizados sobre la glicoproteína J son muy limitados se sabe que es la principal proteína de superficie del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar y fue inicialmente llamada glicoproteína 60K (gp60) debido a que fue detectada por anticuerpos monoclonales con un peso molecular de 60 KDa (35), pero, debido a que el gen que la codifica ocupa una posición homóloga al gen US5 localizado en el ORF5 de la región US del genoma del herpes virus simple-1 (HSV-1) esta proteína fue denominada glicoproteína J (gpJ). Sin embargo, gpJ del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar comparte una mayor identidad aminoacídica con su proteína respectiva en herpes virus de caballo-1 y 4 (EHV-1 y EHV-4) de 24-26% en comparación con HSV-1 (40).

Un estudio posterior detectó la presencia de bandas de aparentes pesos moleculares de 85, 115, 160 y 200 kDa no observándose una banda de 60 kDa y una microscopía inmunoelectrónica reveló la presencia de esta glicoproteína en la envoltura viral de laringotraqueitis infecciosa aviar. Además, sueros de pollo infectados naturalmente o experimentalmente con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar y los anticuerpos monoclonales

producidos a partir de virus purificados fueron capaces de reconocer gpJ mostrándose así su alta inmunogenicidad (41).

Posteriormente se demostró que la proteína de 85KDa provenía de la secuencia cDNA que sufrió corte y empalme del gen que codifica a gpJ y que las proteínas obtenidas de 115, 160 y 200 kDa son producto de la secuencia de mRNA que no sufrió corte y empalme no obstante estas secuencias sufrieron modificaciones traduccionales (40).

Estudios basados en la generación de virus que presentan deleción de gpJ demuestra que el título viral en los sobrenadantes de cultivos con células infectadas disminuyó marcadamente por lo cual indica que gpJ tiene un rol importante durante la salida del virus de la célula (42).

7. Inmunología aviar contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar: respuesta humoral y respuesta mediada por células

Análogamente a otros animales la maduración de las células T en aves se realiza en el timus, sin embargo, a diferencia de otras especies, las aves presentan un órgano linfoide particular conocido como bursa de Fabricio, localizada en la región del proctodeo de la cloaca, la cual es esencial para la amplificación y diferenciación de células B progenitoras y por ende para la producción de anticuerpos (respuesta humoral) (43, 44).

La remoción quirúrgica de la bursa de Fabricio o bursectomía durante el desarrollo temprano embrionario demostró un alto daño del sistema inmune humoral, no obstante la bursectomía durante el desarrollo tardío embrionario

mostró una reducción marcada del número de linfocitos B circulantes así como una ausencia total en la producción de anticuerpos (43). Otro estudio realizado en pollos bursectomizados a las 2, 5 y 10 semanas de edad y posteriormente expuestos a *Salmonella typhimurium* y células sanguíneas de oveja mostró que cuanto más tardíamente eran los pollos bursectomizados la producción de anticuerpos no se veía afectada a pesar de ser expuestos constantemente al antígeno (45).

Estudios realizados sobre el rol de la respuesta humoral en infecciones del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar no detectaron anticuerpos en suero de aves que habían sido sometidas a bursectomía y tratados con ciclosfosfamida el primer día de edad, posteriormente vacunados con la cepa australiana SA2 ILTV y desafiados con cepa silvestre del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. A pesar de la no producción de anticuerpos debido a la ablación de la respuesta humoral no hubo reducción de la respuesta protectora de la vacuna por lo cual se concluyó que probablemente la respuesta inmunológica inducida por la vacuna es independiente de la inducción de la respuesta humoral. De la misma manera se evaluó la inmunidad pasiva mediante la inoculación de suero hiper-inmune contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en pollos que fueron posteriormente desafiados detectándose anticuerpos circulantes y observándose signos clínicos característicos de la enfermedad. Dichos resultados sugieren que probablemente la presencia de anticuerpos maternos contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar como inmunidad pasiva en pollos recién nacidos no ejerza ninguna protección o interferencia contra el

virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (46). Asimismo la ausencia de anticuerpos en las áreas mucosas de la tráquea en pollos bursectomizados posteriormente vacunados y desafiados no evidenció la presencia de infección en tráquea mediante inmunofluorescencia como anteriormente se mencionó que los anticuerpos de áreas mucosas podrían tener un rol muy importante en la recuperación de la infección (47).

Un estudio posterior señala que una fuerte producción de anticuerpos en pollos inmunizados con la vacuna vectorizada HVT-LT que expresa glicoproteínas del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar no puede ser interpretada como una medida de protección sino como una indicación de recepción de la vacuna por el pollo y como una evidencia de la antigenicidad de las glicoproteínas expresadas por el vector puesto que a pesar de la producción de anticuerpos se detectó la presencia de virus en tráquea y ligera disminución de signos clínicos posterior al desafío (48). Además, estudios previos señalan la alta inmunogenicidad de las glicoproteínas por su capacidad de ser reconocidas por anticuerpos monoclonales y por anticuerpos presentes en el suero de aves y conejos infectados con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (35).

Adicionalmente, York J. y Fahey K. demostraron que la fracción de glicoproteínas del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar obtenidas mediante inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales específicos fue capaz de inducir una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en el zarzo de pollo previamente inmunizados contra este virus enfatizando así una respuesta inmune mediada por células (34).

Posteriormente, se reportó que la glicoproteína G (gpG) de naturaleza secretada del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar tiene la capacidad de interactuar con quimioquinas recombinantes de origen animal y humano. La interacción de gpG con quimioquinas representa probablemente un mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero por parte del virus. La delección de gpG del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar permitió el reclutamiento de heterófilos, células homólogas a los neutrófilos en mamíferos (49), al área de infección (tráquea) así como el incremento local en el número de linfocitos CD4 y CD8 y una disminución en el número de linfocitos B y por consiguiente una reducción en la producción de anticuerpos. Así la delección de gpG altera la respuesta inmune del hospedero comparado con una respuesta inmune ocasionada por la infección de un virus completo (sin delección) resaltándose la importancia de gpG en estadios tempranos de la infección y por ende en la respuesta innata del hospedero (38, 50).

Coppo y colegas describieron a gran detalle que gpG tiene una alta afinidad por quimioquinas inhibiendo la migración y activación de células inmunes especializadas. De esta manera el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar evade la respuesta inmune del hospedero modulando la respuesta inmune celular e innata favoreciendo la respuesta humoral y favoreciendo la supervivencia del virus (39).

8. Desarrollo de vacunas aviares contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar y la necesidad por la implementación de nuevas estrategias

para el desarrollo de éstas. Baculovirus: vehículo presentador de antígenos heterólogos

8.1 Problemática del desarrollo de vacunas contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

Desde 1930, después del primer reporte de la presencia del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en Estados Unidos se ha utilizado virus vivos modificados de baja virulencia o atenuados como cepas vacunales (51). La modificación de dichos virus fue realizada mediante pasajes sucesivos en cultivos celulares cuya atenuación fue demostrada mediante la formación de lesiones atípicas en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo y la reducción de la virulencia en aves susceptibles (52). El uso de enzimas de digestión de ADN (endonucleasas de restricción) permitió identificar patrones de fragmentos de ADN (pesos moleculares) obtenidos a partir de la digestión de ADN viral, dichos patrones fueron empleados para determinar que cepas aisladas de campo presentaron patrones correspondientes a cepas vacunales, de los resultados se concluyó que las cepas usadas como vacunas serían la causa del brote del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar como resultado de la reversión a la virulencia parental (53). No obstante, debido a que las cepas vacunales provienen de aislados de campo se consideró que el análisis de ADN mediante enzimas de restricción no permitía distinguir a las diferentes cepas a pesar que éstas presentaban marcadas diferencia en patogenicidad (51).

Asimismo, se propuso que probablemente los brotes causados por cepas vacunales fueron originados debido a la insuficiente atenuación que podría sumarse a las condiciones de los galpones (54). Sin embargo, un estudio posterior reportó que cepas usadas como vacunas obtenidas por pasajes sucesivos en embriones de pollo (CEO, chick embryo origen) demostraron mayor virulencia que cepas obtenidas por pasajes sucesivos en cultivo celular (TCO, tissue culture origin) cuando éstas son transmitidas de ave a ave (55) motivo por el cual la transmisión de cepas vacunales de pollos vacunados a pollos no vacunados podría significar un pasaje sucesivo del virus y un incremento en la virulencia de la cepa.

Posteriormente se identificaron 2 puntos de recombinación mediante el alineamiento de genomas del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. Dichos genomas fueron obtenidos mediante secuenciamiento de última generación empleando genomas provenientes de cepas virulentas (clase 8 y 9) recientemente detectadas en Australia y asociadas a brotes causantes del incremento en la mortalidad de hasta 17.6% así como genomas de cepas vacunales de origen australiano SA2 y A20 (Pfizer, Australia) y de origen europeo SERVA (Intervet). El alineamiento de genomas demostró que la mayoría de secuencias pertenecientes a las cepas virulentas (clase 8 y 9) fueron altamente idénticas a SERVA. Se detectó además polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) en distintas regiones únicas para cada clase, las secuencias de estas regiones fueron altamente idénticas con las cepas SA2

y A20 identificándose recombinaciones entre cepas vacunales australianas y europeas dando como resultado cepas emergentes virulentas (clase 8 y 9) (56), asimismo el uso de herramientas bioinformáticas permitió detectar puntos de recombinación en la secuencia única larga así como en la región invertida repetitiva del genoma (57). Sin embargo, un estudio posterior realizado en Estados Unidos determinó que las cepas virulentas 63140 y 81658 de origen norteamericano eran muy cercanas a las cepas vacunales CEO y TCO respectivamente por lo cual no hay evidencia de eventos de recombinación entre éstas cepas vacunales, así se propuso que dicha virulencia probablemente pueda surgir mediante otro mecanismo diferente a la recombinación homóloga comparado con lo descrito en cepas virulentas australianas (58).

La búsqueda de nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar que permitan la inducción de una respuesta inmune protectora evitando el uso de vacunas atenuadas que puedan revertirse es de vital importancia. El uso de genomas de virus como vectores portadores de antígenos virales que afectan a pollos ha sido ampliamente explorado en la industria avícola (59-63).

En 1992 se publicó un estudio basado sobre el desarrollo de vacunas avícolas usando cepas recombinantes de herpesvirus de pavo (HVT, herpesvirus of turkey) que contenían secuencias codificantes de las proteínas de hemaglutinina-neuraminidasa y de fusión del virus aviar de

Newcastle insertadas en genes no esenciales de HVT (64). La expresión de la glicoproteína B, proteína altamente conservada y esencial para la adhesión y penetración del virus a la célula, del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar fue desarrollada usando al herpesvirus de pavo como vector demostrándose su eficacia como vacuna en pollos comerciales y libres de patógenos. Dicha eficacia en pollos comerciales fue evaluada mediante desafío a las 21 y 35 días de edad de pollos vacunados *in ovo* observándose 67% (10/15) y 87% (13/15) de pollos que no desarrollaron signos clínicos respectivamente (60). Sin embargo, debido a que el virus HVT está asociado a células resulta muy costosa la producción debiendo ser éstas transportadas y preservadas en nitrógeno líquido (59).

Asimismo el uso del genoma del virus fowlpox (FPV) como vector para la expresión de la glicoproteína B del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en pollos desafiados a los 35 días de edad demostró 100% de protección identificándose la ausencia de signos clínicos y 85% de protección para pollos inmunizados con la vacuna comercial Nobilis ILT (62). No obstante se ha reportado que la respuesta inmune específica es menor comparada con el uso de vacunas atenuadas siendo necesario una dosis de refuerzo (65) e incluso se sugirió el uso de éstas en combinación con vacunas convencionales con el propósito de optimizar la respuesta inmune (59).

Finalmente, un estudio comparativo de vacunas atenuadas y vectorizadas (HVT-LT y FPV-LT) demostró que las vacunas atenuadas, administradas a los 14 días de edad, reducen significativamente signos clínicos propios de la enfermedad causada por el virus de laringotraqueitis aviar tanto en pollos comerciales vacunados y desafiados a los 35 y 57 días en comparación con las vacunas vectorizadas. No obstante, los pollos vacunados con HVT-LT (Innovax ILT, Intervet) fueron más efectivos que FPV-LT (Vectormune, Ceva), vacunas administradas in ovo y subcutáneamente el primer día de edad, porque redujeron los signos clínicos y carga viral en pollos desafiados a los 57 días en comparación de los pollos desafiados a los 35 días (48) proponiéndose la co-administración de inmunomoduladores que permitan aumentar la respuesta inmune lo cual nos sugiere que la respuesta inmune del pollo ante la presencia del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar este siendo inducida aproximadamente 8 semanas después de la vacunación lo que realmente representa una inducción deficiente debido al ciclo de vida de pollos comerciales. No obstante, los autores sugieren que la transferencia de anticuerpos maternos generados contra FPV a pollos haya sido probablemente un factor que impidió una respuesta protectora para el caso de FPV-LT (48).

Si bien se ha reportado que el uso de vacunas inactivadas induce una buena protección en pollos inmunizados y posteriormente desafiados (66), los costos de producción de la vacuna resultan ser muy altos (67).

8.2 Necesidad por la generación de nuevas vacunas contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. Baculovirus: vehículo presentador de antígenos heterólogos

Debido a la falta de correlación entre el título de anticuerpos y la respuesta inmune protectora, se hace énfasis en la respuesta inmune celular (26) y en las células efectoras de la inmunidad innata (39). Los monocitos conforman aproximadamente entre el 5-10% de células leucocitarias periféricas de sangre en pollos pero esto puede variar dependiendo del linaje del pollo (43). Estas son parte de la primera línea de defensa las cuales migran a diferentes tejidos para diferenciarse en macrófagos (68).

Los receptores Toll-like receptors (TLRs) forman parte del grupo de receptores pattern-recognition receptors (PRRs) que tienen la capacidad de reconocer un amplio número de ligandos debido a que estos ligandos comparten patrones moleculares en común. Estos TLRs se encuentran localizados en macrófagos, células B (69) y heterófilos aviares (70).

Estudios previos señalan que TLR21 de aves (chTLR21), homólogo TLR9 de mamíferos, esta presente en macrófagos, siendo por ello capaces de modular la activación celular y producción de citoquinas (71). ChTLR21 está localizado en el retículo endoplasmático cuya activación sólo ocurre cuando estos son translocados a endolisosomas. Al igual que TLR9, chTLR21 tiene la capacidad de reconocer islotes de CpG no metilados (72) de origen viral y bacteriano (73), así se demostró que CpG

oligodeoxinucleótidos (ODN) tiene la capacidad de estimular la producción de IFN- γ inductor de la respuesta inmune de tipo Th1 (71).

De la misma manera se reportó que aves desafiadas con virus de influenza aviar y previamente inoculadas con CpG ODN, ligando de chTLR21, fueron capaces de reducir significativamente la diseminación viral y promover la expresión de mRNA de IFN- γ en pulmón (73).

Otro estudio reportó el incremento en la expresión de IL-1 β , IFN- γ , IFN- β y IFR-7 así como el aumento de la producción de óxido nítrico (NO) en la línea celular de macrófagos aviares MQ-NCSU estimulados por CpG ODN 1826, además de la reducción del título viral en macrófagos estimulados con CpG ODN 1826 y posteriormente infectados con virus de influenza aviar. Este incremento en la expresión de estos genes se infiere como un producto de la estimulación de CpG ODN con los receptores TLR presentes en la membrana del macrófagos. Dicha interacción promueve la activación de macrófagos fortaleciendo la respuesta inmune innata y reduciendo el título viral (74).

Además un estudio realizado en bronquitis infecciosa aviar propone el uso de baculovirus como agente inmunomodulador capaz de interactuar con receptores TLR promoviendo el incremento en la expresión chIL12, ChIL6 e IFN- γ (75). Asimismo, otro estudio posterior detallada la inducción de la expresión de chIL12 modulado por chTLR21 en macrófagos de aves expuestas a baculovirus (76).

Del estudio de Han y colegas se evidencia que tanto CpG y baculovirus son probablemente ligandos para chTLR21, ambos ligandos tienen la propiedad de estimular el sistema inmune de aves mediante la inducción de citoquinas que permiten la polarización de la respuesta inmune de tipo Th1 (76).

La versatilidad de baculovirus como un vehículo presentador de antígenos que tiene la capacidad de transducirse en células diferentes a la de su huésped natural como son las células de insecto hace de este sistema de expresión de proteínas muy ventajoso y útil por ser además inocuo debido a que si bien no puede replicarse en otras células diferentes a su huésped se ha reportado que genes que están bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) pueden ser expresados en células de mamíferos y en células de fibroblasto de embrión de pollo (77). Además, el uso estratégico de una de las fases de replicación (replicación bifásica) conocida como virus de brote permite el uso de la glicoproteína 64 (gp64) presente en la envoltura viral de baculovirus durante las primeras 16 a 24 horas post-infección facilitando la fusión e incorporación de una proteína de interés para su expresión en la envoltura de baculovirus permitiendo su exposición y fácil reconocimiento al sistema inmune del huésped (78-80). gp64 presenta una secuencia rica en lisinas mediante la cual se darían interacciones electrostáticas con receptores de células distintas a las células de insecto que contienen sulfatos de heparina (81), no obstante, aún se desconoce el mecanismo exacto (82). Es necesario mencionar que las proteínas producidas usando este sistema de expresión presentan un mejor

plegamiento comparado con el uso de células bacterianas y que si bien las modificaciones pos-traduccionales están presentes en las proteínas producidas estas modificaciones no son tan complejas como las modificaciones pos-traduccionales en células de mamíferos (83). Estas características junto a sus propiedades como adyuvante resaltan aún su aplicación como agente inmunomodulador del sistema inmune (84).

La generación de nuevas vacunas que permitan potenciar la respuesta inmune celular son de vital importancia para combatir la enfermedad ocasionada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar que depende mucho de la estimulación de la inmunidad celular del huésped es por ello que este trabajo propone a baculovirus, virus de célula de insecto, como un agente adyuvante que potencia la respuesta celular mediante la inducción de citoquinas paralelo al reconocimiento de la glicoproteína J por el sistema inmune adaptativo cuyas perspectivas se ven reflejadas en los diferentes trabajos publicados en el uso de baculovirus como un vehículo presentador de antígenos (61, 85-88).

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

La enfermedad viral causada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en la industria avícola representa grandes pérdidas económicas no sólo a nivel local sino también a nivel internacional provocando incrementos tanto en la mortalidad como en la morbilidad de pollos resultando en el alza de los productos derivados como los huevos (15, 16).

El desarrollo de diversas estrategias para el control de la enfermedad nos ha mostrado a través de los años que el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar por ser un alphaherpesvirus tiene la capacidad de recombinarse (89), evidencia de ello fue el uso de vacunas atenuadas obtenidas por pasajes sucesivos (cepas vacunales) que puede convertirse en focos de infección y diseminación al darse recombinación entre cepas vacunales resultando los virus de la progenie ser aún más virulentos (56).

Del mismo modo, el uso de vacunas vectorizadas que expresan genes propios del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar demostraron no ser capaces de inducir una respuesta inmune temprana (48) lo cual podría favorecer el desarrollo de la enfermedad en los primeros días de edad del ave.

Sin embargo, debido a que una producción de anticuerpos no puede interpretarse como una respuesta inmune protectora sino como un marcador de alta antigenicidad de las glicoproteínas virales (48) se plantea que la respuesta inmune innata y mediada por células tendrían un rol relevante como medio de defensa del hospedero ante una infección viral, apoyándose esta idea en la descripción detallada de la existencia de la glicoproteína G secretada de origen viral la cual bloquea la actividad biológica de las

quimioquinas mediante su interacción con éstas, evitando el reclutamiento de células especializadas del sistema inmune al área de infección permitiendo así la replicación viral (39).

Por lo cual este estudio busca el uso de estrategias diferentes que permitan estimular la respuesta celular asociada a la inmunidad innata promoviendo la activación de células efectoras capaces de controlar el desarrollo de la enfermedad causada por el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.

JUSTIFICACIÓN

La necesidad por nuevas vacunas que permitan no sólo estimular la respuesta humoral mediante la producción de anticuerpos, sino también mediante la activación de células especializadas del sistema inmune que induzcan la producción de citoquinas que refuercen la respuesta inmune mediada por células así como la estimulación de la inmunidad innata se enmarca dentro de la problemática del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar puesto que ha sido reportado que la producción de anticuerpos no es una evidencia del desarrollo de una respuesta protectora durante la enfermedad provocada por este virus en las aves

Por ello se plantea el uso de baculovirus como vehículo presentador de antígenos de interés capaz de ser reconocido e interactuar con células efectoras de la inmunidad innata. Además, baculovirus se caracteriza por ser un agente inmunomodulador (adyuvante) ya que estudios previos demostraron que puede inducir la producción de citoquinas de tipo Th1 como IFN- γ y la producción de citoquinas responsables de la polarización de la respuesta inmune de tipo Th1 como IL12 en líneas celulares de macrófagos reforzando de esta manera la inmunidad innata como primera línea de defensa del hospedero. La interacción de baculovirus con células presentadoras de antígeno mediante los receptores TLR permitirá la activación de otras células especializadas del sistema inmune innato como células NK potenciando la respuesta inmune innata para el control y reducción de la replicación viral y promoviendo el desarrollo de una consistente respuesta inmune adaptativa capaz de proteger a las aves de futuras infecciones.

La utilización del sistema de expresión de proteínas en células de insecto (baculovirus) en el desarrollo de potenciales vacunas a ser usadas en la industria avícola permitirá evitar las consecuencias del uso de vacunas atenuadas, que pueden recombinar y generar reacciones pos-vacunales; además, baculovirus es inocuo a otras células diferentes de su huésped natural puesto que no puede replicarse por lo cual no generaría reacciones adversas en las aves inmunizadas.

Este estudio contribuiría al desarrollo de vacunas en el campo veterinario basadas en baculovirus como vehículo presentador de antígenos heterólogos resaltando su capacidad de estimular el sistema inmune de aves.

HIPOTESIS

Baculovirus recombinante que expresa la glicoproteína J en su envoltura viral inducirá una respuesta inmune protectora ante desafíos con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol protector en aves SPF de un baculovirus recombinante que expresa la gpJ en su envoltura viral mediante ensayos de desafío frente al virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Ensamblaje *in silico* del plásmido donador recombinante “Ch-gpJ” mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
2. Expresión y producción de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en células de insecto (línea celular Sf9).
3. Estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pollo mediante exposición a baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.
4. Evaluación *in vivo* de aves inmunizadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y posteriormente desafiadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.

DISEÑO DEL ESTUDIO

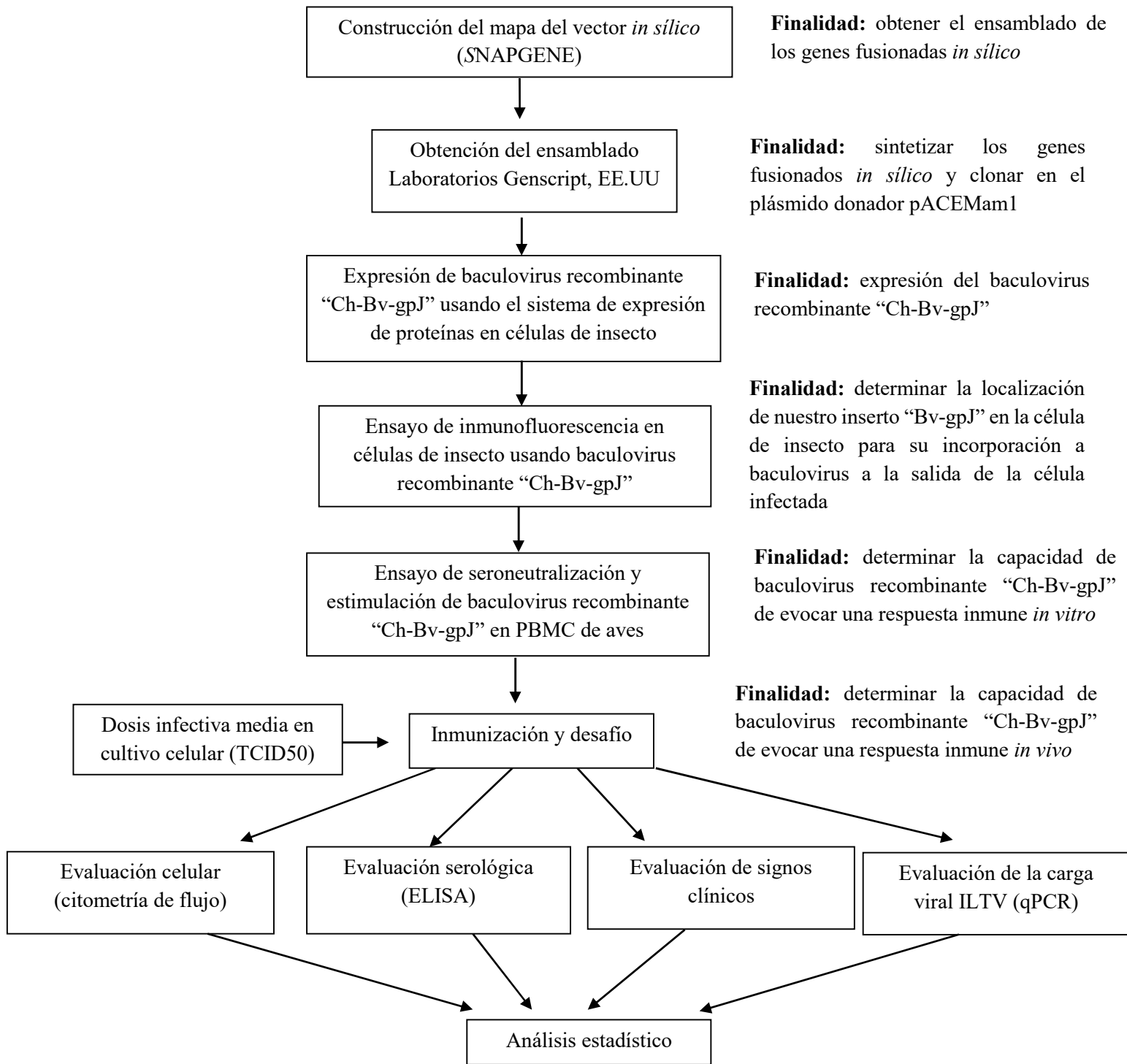


Figura 1. Esquema del diseño del estudio

METODOLOGÍA

1. Componente: Bioinformático

1.1 Ensamblaje *in silico* del plásmido donador recombinante “Ch-gpJ” (mapa del vector)

El ensamblaje *in silico* se realizó con el programa bioinformático SnapGene® (V2.3.5, 2010, EE.UU.) (www.snapgene.com). La secuencia nucleotídica de la glicoproteína J (gpJ) de ILTV fue flanqueada en el extremo 3' por la secuencia del péptido señal (SP) y en el extremo 5' por la secuencia del dominio transmembrana (TMD) de la glicoproteína 64 (gp64) de baculovirus. Además, la secuencia nucleotídica gpJ se fusionó el gen reportero DsRed que nos permitió monitorear la expresión y localización de gpJ. Estas secuencias fusionadas *in silico* a las cuales llamamos “Bv-gpJ” (Fig. 2) fueron sintetizadas por fragmentos en plásmidos pUC57 (fragmento 1: SPgp64-DsRed-TMDgp64-6xhis; fragmento 2: gpJ) en Laboratorios Genscript, EE.UU. (Anexo Tab. A1 y A2).



Figura 2. Esquema del Ensamblado del inserto “Bv-gpJ”

1.2 Obtención del plásmido donador recombinante “Ch-gpJ”

El fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ” fue clonada en el plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza) (Fig. 3 y Anexo Tab. A3 y A4) usando las enzimas de digestión EcoRI y HindIII y luego el fragmento 2 fue clonado usando XbaI y SmaI generando un nuevo plásmido donador recombinante llamado “Ch-gpJ” en donde la secuencia “Bv-gpJ” estuvo bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (CMV).

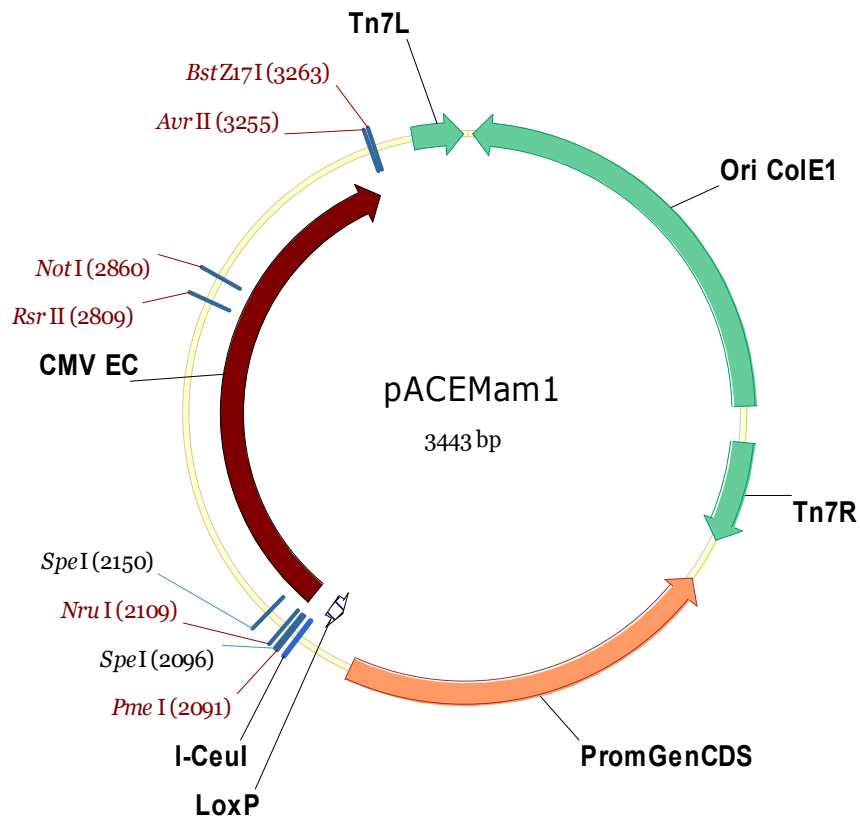


Figura 3. Mapa del plásmido donador pACEMam1. (Geneva Biotech, Suiza)

2. Componente: Sistema de expresión de proteínas en células de insecto (baculovirus)

2.1 Preparación de células químicamente competentes *Echerichia coli* (*E. coli*) cepa DH5-alfa y DH10BacVSV (90)

- 2.1.1 Se sembró por agotamiento una colonia de *E. coli* de la cepa DH5-alfa en una placa que contiene agar-LB (Luria-Bertani) sin antibiótico, del mismo modo se sembró una colonia de *E. coli* de la cepa DH10BacVSV (Geneva Biotech, Suiza) en una placa que contiene agar-LB con el antibiótico kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), blu-Gal (100 µg/mL) e IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (40 µg/mL), y se incubó a 37°C por 16 horas.
- 2.1.2 Se agregó una colonia de *E. coli* de la cepa DH5-alfa a un tubo de 6 ml con medio LB sin antibiótico y de la misma manera se agregó una colonia azul de *E. coli* de la cepa DH10BacVSV a un tubo de 6 ml con kanamicina (50 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL) para luego incubar a 37°C a una agitación de 200 rpm por 16 horas.
- 2.1.3 Se tomó 1 ml de cultivo bacteriano y se adicionó a 50 ml de medio LB sin antibiótico para la cepa DH5-alfa y con antibióticos para la cepa DH10BacVSV (ver 2.1.2). Se incubó a 37°C a una agitación de 200 rpm hasta que su densidad óptica (DO) a 600 nm sea de 0.3-0.4 (0.35 óptimo).

- 2.1.4 Se pasó el contenido a tubos de 50 ml enfriados previamente (-80°C) e incubó en hielo durante 10 minutos.
- 2.1.5 Se centrifugó a 4583 rpm a 4°C por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y secó bien el pellet. Se dejó los tubos en posición invertida sobre un papel toalla para eliminar todas las trazas de medio.
- 2.1.6 Se resuspendió el pellet en 20 ml de 0.1 M de CaCl₂ y homogenizó suavemente. Se incubó durante 15 minutos en hielo.
- 2.1.7 Se centrifugó a 4583 rpm a 4°C por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.
- 2.1.8 Se resuspendió el pellet con 1 ml de la mezcla 0.1 M de CaCl₂ al 15% de glicerol y se homogenizaron suavemente.
- 2.1.9** Se dispensó en fracciones de 100 µl en tubos de 1.5 ml estériles colocados en una caja conteniendo isopropanol previamente enfriado a -20°C. Se guardó a -80°C.

2.2 Transformación de células bacterianas químicamente competentes de la cepa DH5-alfa con el plásmido “Ch-gpJ” (90)

- 2.2.1 Se agregó 200 ng del plásmido “Ch-gpJ” a 100 µl de suspensión de células competentes. Esta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos seguido de choque térmico de 45 segundos a 42°C en baño maría y 2 minutos en hielo.

2.2.2 Se añadió 800 µL de medio SOC (Life Technologies, EE.UU.) y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación de 150 rpm.

2.2.3 Se sembró 70 µl de suspensión bacteriana en una placa LB-agar con gentamicina (7 µg/ml) y se incubó a 37°C por 24 horas.

2.3 Purificación del plásmido “Ch-gpJ”

2.3.1 La purificación del plásmido “Ch-gpJ” se realizó a partir de 5mL de cultivo de la cepa DH5-alfa utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La correcta transformación se corroboró mediante secuenciación del plásmido “Ch-gpJ” así como por digestión enzimática utilizando XbaI y SmaI (New England Biolabs, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4 Transformación/Transposición de células bacterianas químicamente competentes de la cepa DH10BacVSV con el plásmido “Ch-gpJ”.(Fig. 4A y 4B) (90)

2.4.1 La transposición del plásmido “Ch-gpJ” en el b́acmido (el cual contiene el genoma de baculovirus y el gen de resistencia de kanamicina) presente en la cepa DH10BacVSV de *E. coli* se realizó usando los sitios de reconocimientos denominados Tn7R y Tn7L. La transposición se realizó en presencia de un plásmido ayudador presente en la cepa DH10BacVSV que contiene la secuencia del gen

de resistencia de tetraciclina y la secuencia codificadora de la transposasa que facilitará la transposición (91) (Barry G., 1988).

- 2.4.2 Se agregó 200 ng del plásmido “Ch-gpJ” a 100 µl de suspensión de células competentes y se incubó en hielo por 30 minutos seguido de choque térmico de 45 segundos a 42°C en baño maría y 2 minutos en hielo.
- 2.4.3 Se añadió 800 µL de medio SOC (Life Technologies, EE.UU.) y se incubó por 4 horas a 37°C con agitación de 200 rpm.
- 2.4.4 Posteriormente 70 µL células transformadas fueron sembradas en placas LB-agar que contienen kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), IPTG (40 µg/mL) y blue-Gal (100 µg/mL) y se incubó a 37°C por 48 horas.
- 2.4.5 Se tomó una colonia blanca y se sembró en 6 mL de medio LB que contiene gentamicina, kanamicina y tetraciclina (ver 2.4.4) a 37°C y 200 rpm, posteriormente 1mL del cultivo se hará crecer en 50 ml de medio LB con gentamicina, kanamicina y tetraciclina a 37°C y 200 rpm.
- 2.4.6 La purificación del “bácmido-Ch-gpJ” se realizó usando el kit Plasmid Purification Midiprep (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para confirmar la transposición se diseñaron cebadores que amplificaron una región de gpJ, luego la secuencia amplificada fue secuenciada.

2.5 Transfección de células de insecto (Sf9) con el “bácmido - Ch-gpJ” recombinante (Fig. 4-C) (92)

- 2.5.1 La transfección de “bácmido-Ch-gpJ” en células de insecto Sf9 se realizó utilizando el lípido catiónico Cellfectin II (Life Technologies, EE.UU). Para lo cual se usó una placa de 6 pozos con 8×10^5 células Sf9/pozo en 2 ml de medio de cultivo de insecto sin suero fetal bovino (SFB) y sin antibióticos.
- 2.5.2 Se mezcló 8 μ L de Cellfectin II con 100 μ L de medio no suplementado y sin antibióticos en un microtubo de 1.5 mL y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2.5.3 En otro microtubo de 1.5 mL se agregó 1 μ L (1 μ g total) de “bácmido-Ch-gpJ” purificado (1 μ g total) con 100 μ L de medio no suplementado y sin antibióticos. Se combinó ambos contenidos y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
- 2.5.4 Luego se añadió los 210 μ L de la mezcla obtenida a cada pozo que contiene las células sembradas y se incubó por 3 a 5 horas a 27°C.
- 2.5.5 Se removió la mezcla de la transfección y se colocó 2 mL de medio suplementado sin antibióticos. Luego se incubó las células a 27°C por 120 horas.
- 2.5.6 El quinto día se cosecharon las células transfectadas de cada pozo y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el pellet y se guardó el sobrenadante a 4°C protegido de la luz. Este sobrenadante esto fue considerado como “P0” de

baculovirus o stock inicial de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

2.6 Amplificación viral del baculovirus “Ch-Bv-gpJ” recombinante (Fig. 4-D). (93)

- 2.6.1 La amplificación viral de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” se realizó en cultivos de células de insecto Sf9 en flasks de 25 cm² (4 x 10⁶ células totales), 75 cm² (1.2 x 10⁷ células totales), 225 cm² (3.6 x 10⁷ células totales) y en spinner de 100 mL a una densidad celular de 1.5 x 10⁶ células/mL (células en suspensión) con el fin de incrementar el stock viral de “Ch-Bv-gpJ”. Todos los sobrenadantes obtenidos de cultivo celular fueron guardados con 2% de SFB a 4°C.
- 2.6.2 Para cada pasaje de cultivo celular se realizó la detección de fluorescencia del gen reportero mCherry presente en la secuencia genómica del propio bácido usando el microscopio ZEISS Observer A1 AXIO con sistema Colibri.2 mediante filtros estándares y a una amplificación de 200X.

2.7 Titulación viral por ensayo de placa (Fig. 4-D).

- 2.7.1 El producto obtenido de la amplificación viral de “Ch-Bv-gpJ” fue utilizado para la titulación viral por ensayos de placa, para lo cual se usó dos placas de 6 pozos que contienen 1 x 10⁶ células de insecto/pozo en 2mL de medio de cultivo de insecto sin SFB. Las

células se incubaron por 1 hora a 27°C para permitir que se adhiran al fondo de cada placa.

- 2.7.2 Se removió el medio y se colocó 1 mL/pozo de cada dilución seriadas de virus (por duplicado) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Preparación de diluciones seriadas de factor 1/10 (virus):

Para ello se diluyó 0.5mL de virus obtenido de la amplificación viral en 4.5 mL de Grace's insect medium 1x (Invitrogen, EE.UU) sin SFB haciendo 8 diluciones consecutivas seriadas de la misma manera hasta lograr la dilución deseada. Se trabajará con diluciones comprendidas entre 10^{-4} a 10^{-8} .

- 2.7.3 Se removió las diluciones de virus de cada pozo y se colocó 2 mL de agarosa al 1% (Invitrogen, EE.UU).

Preparación de agarosa al 1% (para 2 placas de 6 pozos):

- a) Se agregó 5mL de SFB inactivado (inactivación a 56°C por 30 minutos) a un frasco de 50mL que contiene 25 mL de Grace's insect medium 2x (Life Technologies, EE.UU).
- b) De a) mezcla se tomó 12.5mL y se mezcló con 6.25 mL de agua ultra-purificada y colocó en un frasco estéril de 50mL a 37-40°C en baño maría.
- c) 0.25g de agarosa se disolvió en 6.25mL de Grace's insect medium 1x sin SFB y se calentó a 70°C por 10-20 minutos

(baño maría) y se mezcló junto a la solución del rubro b) a 37-40°C.

- 2.7.4 Se permitió solidificar la agarosa por 1 hora a temperatura ambiente. La placa se incubó a 27°C en un ambiente húmedo por 7-10 días.
- 2.7.5 Al décimo día se agregó a cada pozo de la placa 2mL de ácido tricloroacético al 20% y se dejó incubar por 30 minutos.
- 2.7.6 Se retiró el ácido tricloroacético de cada pozo de la placa y luego se procedió a remover la agarosa con ayuda de un bisturí.
- 2.7.7 Se agregó 800µL de cristal violeta (0.1% de cristal violeta en 20% de metanol) a cada pozo por 5 minutos. Luego se lavó cada pozo utilizando agua destilada y se dejó secar para luego contar las unidades formadoras de placa (UFP).

$$\text{Título} \left(\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número de UFP} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen (mL) de inóculo por pozo}}$$

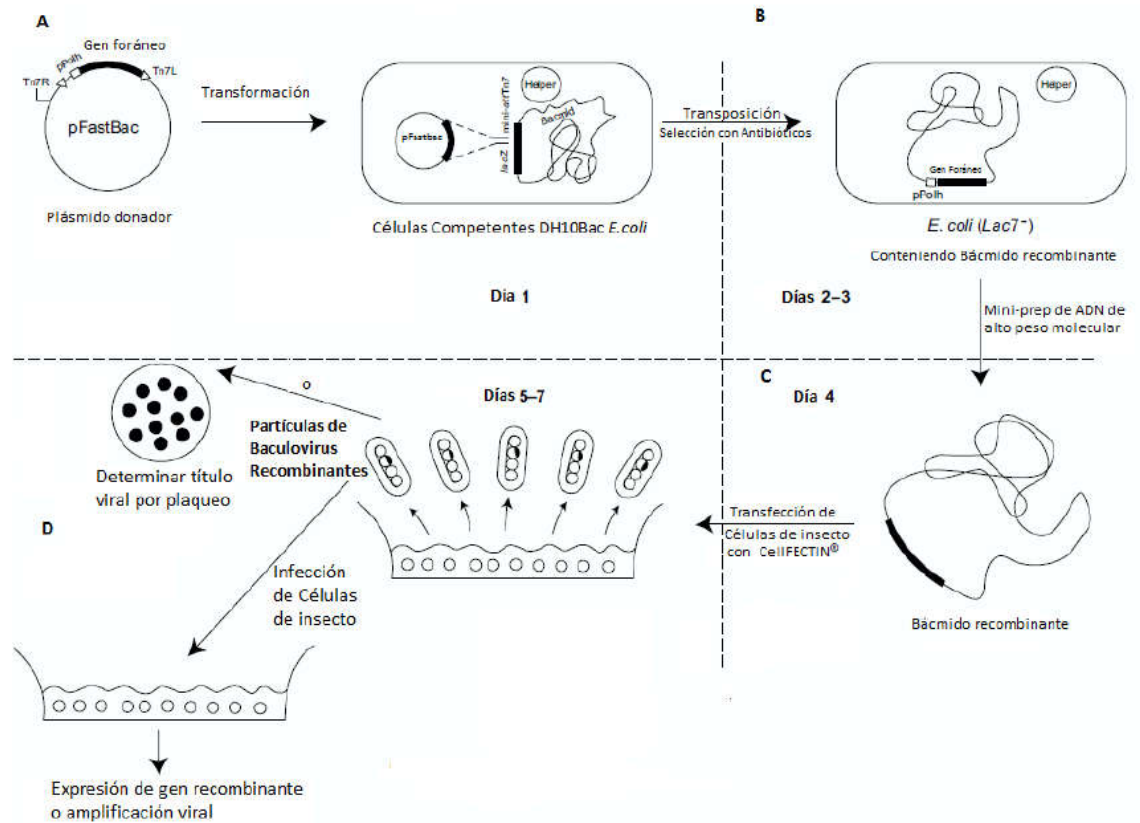


Figura 4. Esquema de trabajo con el sistema de expresión de proteínas en célula de insecto (baculovirus) (94)

2.8 Concentración de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”

2.8.1 Se realizó la concentración de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a partir de sobrenadante de cultivo mediante ultracentrifugación en una ultracentrífuga Optima™ L-100K Ultracentrifuge (Beckman Coulter, EE.UU) utilizando solución de sacarosa al 27% a 24 000 rpm por 1 hora y 30 minutos a 4°C al vacío empleando el rotor SW28.

2.9 Expresión de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en células de insecto (Sf9)

2.9.1 Detección de la cola de histidina (6x-histidina) mediante ensayos de inmunodetección (Western Blot)

2.9.1.1 Para realizar la expresión de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” se sembró 3 matraces con 50 mL de cultivo de célula de insecto Sf9 a una densidad celular de 0.88×10^6 células/mL, las cuales se incubaron durante 24 horas a 27°C.

2.9.1.2 A las 24 horas después de la siembra, las células de insecto fueron infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a MOI (multiplicidad de la infección) de 0.01; 0.05 y 0.1. Durante los días después de la infección, se colectó 1mL de cultivo celular en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Tanto el sobrenadante como el pellet celular fueron usados para evaluaciones posteriores.

2.9.1.3 Al pellet celular se le agregó buffer de lisis (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 10% de DMSO, 4 mM de EDTA, 0.6% de CHAPS e inhibidor de proteasas 1:1000) a una proporción de 1mL de buffer de lisis por cada 20×10^6 células e incubadas a 4°C en agitación durante 16 horas.

- 2.9.1.4 Las células fueron centrifugadas a máxima velocidad por 5 minutos. El pellet obtenido de la centrifugación fue llamado resto celular y el sobrenadante fue llamado lisado celular.
- 2.9.1.5 Se agregó 5x buffer de cargado (90 mM de DTT y 3.64 M de úrea) tanto al lisado celular como a el resto celular y al sobrenadante del pellet celular de tal manera que se colocó 20 µg de muestra por pozo. Estas muestras fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos para luego ser incubadas en hielo durante 2 minutos.
- 2.9.1.6 Se realizó la separación electroforética mediante SDS-PAGE (stacking gel al 5% a pH 6.8 y gel de resolución al 10% a pH 8.8) a 0.01 amperios por 1 hora y 30 minutos, seguido de una transferencia semi-seca de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia eblot™ (Genscript, EE.UU), según las instrucciones del fabricante.
- 2.9.1.7 La membrana de nitrocelulosa que contiene a las proteínas transferidas fue utilizada para el ensayo de western blot. La membrana fue incubada en buffer de bloqueo preparado al 5% de albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma, EE.UU) en buffer PBS durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

2.9.1.8 Se removió el buffer de bloqueo y se agregó 10 mL del anti-histidina (anticuerpo de ratón conjugado a HRP que reconoce 6x-histidina; Genscript, EE.UU) preparado al 2.5% de BSA en buffer PBS a una concentración de 100 ng/mL durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

2.9.1.9 Se removió el anticuerpo y se realizó 3 lavados de 15 minutos con 10 mL de buffer TTBS filtrado (1x buffer: 100 mM Tris-base, 150 mM de cloruro de sodio, 0.01% de Tween 20) y posteriormente se reveló utilizando tabletas de DAB (3,3'- Diaminobenzidina) (Sigma, EE.UU). La reacción de revelado se detuvo agregando agua ultra-purificada.

2.9.2 Detección de gp64 mediante ensayos de inmunodetección (Western Blot)

2.9.2.1 Para llevar a cabo la expresión de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” se sembró 8 matraces con 50 mL de cultivo de célula de insecto a una concentración de 0.88×10^6 células/mL, las cuales se incubaron durante 24 horas a 27°C.

2.9.2.2 Al día siguiente las células de insecto fueron infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante a MOI de 0.1. Cada día se cosechó 2 matraces (uno infectado con baculovirus recombinante y otro infectado con baculovirus no recombinante), a los cuales se

centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos separando en diferentes tubos de 50 mL el sobrenadante del pellet celular.

2.9.2.3 Al pellet celular se le agregó buffer de lisis (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 10% de DMSO, 4 mM de EDTA, 0.6% de CHAPS e inhibidor de proteasas 1:1000) a una proporción de 1mL de buffer de lisis por cada 20×10^6 células e incubadas en agitación a 4°C durante 16 horas.

2.9.2.4 Al día siguiente las células fueron centrifugadas a máxima velocidad por 5 minutos. El pellet obtenido de la centrifugación fue llamado resto celular y el sobrenadante fue llamado lisado celular.

2.9.2.5 Se agregó 5x de buffer de cargado (90 mM de DTT y 3.64 M de úrea) tanto al lisado celular como a el resto celular y al sobrenadante del pellet celular de tal manera que se colocó 20 µg de muestra por pozo. Estas muestras fueron sometidas a 95°C durante 5 minutos para luego ser incubadas en hielo durante 2 minutos.

2.9.2.6 Se realizó la separación electroforética mediante SDS-PAGE (stacking gel al 5% a pH 6.8 y gel de resolución al 8% a pH 8.8) a 0.01 amperios por 1 hora y 30 minutos seguido de una transferencia semi-seca de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema de

transferencia eblot™ (Genscript, EE.UU), según las instrucciones del fabricante.

2.9.2.7 La membrana de nitrocelulosa que contiene a las proteínas transferidas fue utilizada para el ensayo de western blot. La membrana fue incubada en buffer de bloqueo preparado al 5% de albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma, EE.UU) en buffer PBS durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

2.9.2.8 Se removió el buffer de bloqueo y se agregó 10mL de anticuerpo de ratón que reconoce gp64 de baculovirus (Abcam, EE.UU) preparado al 2.5% de BSA en buffer PBS a una dilución de 1/5000 a una concentración de 100ng/mL y se incubó por 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

2.9.2.9 Se removió el anticuerpo y se realizó 3 lavados de 15 minutos con 10 mL de buffer TTBS filtrado (1x buffer: 100 mM Tris-base, 150 mM de cloruro de sodio, 0.01% de Tween 20). Posteriormente se agregó 10mL del conjugado (anticuerpo de cabra conjugado a HRP que reconoce IgG de ratón; Genscript, EE.UU) a una concentración final de 100ng/mL y se dejó incubar por 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

2.9.2.10 Se realizó 3 lavados de 15 minutos con 10 mL de buffer TTBS filtrado por cada lavado y se reveló utilizando tabletas

de DAB (3,3'- Diaminobenzidina) (Sigma, EE.UU). La reacción de revelado se detuvo agregando agua ultra-purificada.

2.9.3 Ensayo de inmunofluorescencia directa para detección de gpJ en células de insecto

2.9.3.1 Se sembró 5.5×10^5 células de insecto/pozo en una placa de 24 pozos. Estas células se infectaron con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a MOI de 1 y el control negativo no fue infectado con a baculovirus. Luego las placas fueron incubadas a a 27°C.

2.9.3.2 A las 48 horas después de la infección, tanto las células infectadas como el control negativo fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas usando el kit Image-iT Fixation/Permeabilization kit (Life Technologies, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9.3.3 Después del bloqueo, se agregó 0.35mL de conjugado (anticuerpo de ratón conjugado a FITC que reconoce 6x-histidina; Genscript, EE.UU) preparado en PBS a una concentración de 1.43 µg/mL por cada pozo

2.9.3.4 La detección del anticuerpo conjugado a FITC y de la expresión de los genes reporteros mCherry y DsRed se realizaron por microscopía de fluorescencia mediante el

microscopio ZEISS Observer A1 AXIO con sistema Colibri.2 utilizando filtros estándares.

3. Componente: Ensayos serológicos e inmunológicos

3.1 Ensayo de Sero-neutralización del baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”

- 3.1.1 Se sembró 1×10^5 células de insecto/pozo en un volumen final de 100 μ L en dos placas de 96 pozos. Se permitió por 1 hora que las células se adhieran al fondo de la placa a una temperatura de 27°C.
- 3.1.2 Tanto los sueros de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (adquiridos de Charles River Laboratories International Inc., EE.UU) como sueros provenientes de aves libres de patógeno (SPF) fueron diluidos sucesivamente en serie a un factor de 1/2 (diluciones de 1/2 hasta 1/4096) en medio de cultivo de células de insecto. La dilución 1/4096 fue considerada como el control de infección.
- 3.1.3 A estas diluciones se agregó baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante a MOI 0.1 y posteriormente estas mezclas fueron incubadas a 37°C por 1 hora.
- 3.1.4 Luego se agregó 100 μ L de cada mezcla a cada pozo por duplicado y se incubó a 27°C por 3 a 6 días. Al control negativo no se le agregó la mezcla.

- 3.1.5 La fluorescencia mCherry fue detectada mediante el equipo Twinkle LB 970 (Berthold Technologies, Alemania) usando filtros estándares. Los parámetros de medición usados fueron: 5000 de intensidad de luz y 0.25 segundos para la captación de fluorescencia.
- 3.1.6 Las intensidades de fluorescencia obtenidas de las muestras que fueron igual o menor al control negativo fueron descartadas, luego las intensidades de fluorescencia (IF) de cada muestra fueron divididas entre el control de infección.
- 3.1.7 Posteriormente se procedió con la normalización de datos usando las siguientes fórmulas:

$$A = IF_1 / IF_2$$

Donde:

A: Intensidad de fluorescencia relativa (IFR) (suero de aves infectadas con ILTV)

1: Intensidad de fluorescencia proveniente de células de insecto expuestas a suero de aves ILTV con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” dividida entre el control de infección.

2: Intensidad de fluorescencia proveniente de células de insecto expuestas a suero de aves ILTV con baculovirus no recombinante dividida entre el control de infección.

$$B = IF_3 / IF_4$$

Donde:

B: Intensidad de fluorescencia relativa (IFR) (suero de aves SPF)

3: Intensidad de fluorescencia proveniente de células de insecto expuestas a suero de aves SPF con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” dividida entre el control de infección.

4: Intensidad de fluorescencia proveniente de células de insecto expuestas a suero de aves SPF con baculovirus no recombinante dividida entre el control de infección.

3.2 Evaluación *in vitro* de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”

3.2.1 Activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (95)

3.2.1.1 La toma de muestra de sangre se realizó de la vena braquial del ala de aves SPF de 36 a 42 semanas de edad, para lo cual se utilizó tubos con heparina de sodio (75USP) (BD Vacutainer, EE.UU).

3.2.1.2 El aislamiento de PBMCs se realizó a partir de 4mL de sangre mediante gradiente de densidad. La sangre fue diluída 1/2 en buffer D-PBS.

3.2.1.3 Posteriormente la mezcla fue colocada sobre histopaque 1077 (Sigma, EE.UU) a un volumen igual al de D-PBS utilizado en la mezcla y centrifugada a 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente.

3.2.1.4 La interfase formada entre el histopaque y la sangre fue tomada para luego ser lavada dos veces en 20 mL de D-PBS y centrifugada a 300 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.2.1.5 El pellet fue resuspendido en 1mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, EE.UU) suplementado. Al medio de

cultivo se agregó 10% de SFB, 2mM de Glutamax-I, 50 μ M β -mercaptoetanol y 1% antibiótico-antimicótico.

3.2.1.6 El conteo de células viables se realizó con tripan blue al 0.4%. Para ello se realizó una dilución 1/40 de las células en buffer D-PBS y dicha mezcla fue diluida 1/2 con tripan blue.

3.2.1.7 Se sembró 10⁶ células por pozo en un volumen total de 50 μ L en una placa de 96.

3.2.1.8 Se agregó baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y no recombinante a MOI 0.05; 0.1 y 0.2 por triplicado. CpG ODN: GTC GTT GTC GTT GTC GTT (96) se usó como control positivo para la inducción de chIL-12 a una concentración de 40 μ M por triplicado. El control negativo no fue expuesto a ningún agente estimulador. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en una suave agitación.

3.2.1.9 Luego se incubó a 41°C en 5% de CO₂, los sobrenadantes de cada pozo fueron recolectados a intervalos de 24; 48 y 72 horas. Previo a la recolección de sobrenadantes las placas fueron centrifugadas a 1000 rpm por 15 minutos y luego guardados a -20°C hasta su uso.

3.2.2 Cuantificación de chIL-12 en sobrenadantes de cultivo de PBMCs mediante ELISA sándwich (Chicken IL12 p40 Do-It-Yourself ELISA, Kingfisher Biotech, Inc.)

- 3.2.2.1 La adsorción del anticuerpo de captura a la placa se realizó a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para chIL-12 preparado en buffer carbonatado (4.3g NaHCO_3 y 5.3g Na_2CO_3 para 1L pH 9.4) de los cuales 100 μL fueron colocados en cada pozo de la placa de ELISA MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Se incubó a 4°C por 16 horas.
- 3.2.2.2 Se lavó 3 veces con 100 μL de buffer de lavado (PBS pH 7.4 al 0.05% Tween 20) y luego se agregó 100 μL de buffer de bloqueo (PBS pH 7.4 al 0.5% BSA al 0.1% Tween 20) y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y luego se eliminó los sobrenadantes de cada pozo.
- 3.2.2.3 La preparación de las proteínas estándares se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante en un rango de 10000 pg/mL a 15.63 pg/mL para chIL-12. Los sobrenadantes producto del ensayo de activación de PBMCs fueron agregados a cada pozo.
- 3.2.2.4 Inmediatamente se agregó 50 μL del anticuerpo de detección preparado en buffer de bloqueo a una concentración de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para chIL-12 respectivamente. Se incubó por 2 horas en agitación a 675 rpm a temperatura ambiente.
- 3.2.2.5 Se lavó 5 veces con buffer de lavado y se agregó 100 μL de estreptavidina-HRP en 5 mL de buffer de bloqueo a una concentración de 200ng/mL.

3.2.2.6 Se agregó 100 μL de TMB (3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina) (Abcam, EE.UU) y se dejó incubar por 30 minutos en agitación a 675 rpm a temperatura ambiente, protegido de la luz.

3.2.2.7 Finalmente se agregó 100 μL de H_2SO_4 a 2N para luego ser leídos a 450nm en el lector de ELISA BioTek™ Eon™ (Fisher Scientific, EE.UU).

4. Componente: Inmunización y desafío

4.1 Ensayo experimental de TCID₅₀ para determinar la dosis infectiva media en cultivo celular para una cepa de campo de ILTV.

El ensayo de TCID₅₀ (dosis infectiva media de cultivo celular) nos permitió calcular la dosis necesaria del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar de campo para el desafío. Para esto se sembró 1.2×10^4 células de hepatoma de pollo (LMH) por pozo en una placa de 96 pozos. El ensayo y el análisis se realizó según Reed and Muench (97).

4.2 Ensayo de inmunización y desafío en aves

Las características de las aves y las condiciones en que se realizó el ensayo se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Grupos de aves para ensayo de inmunización y desafío

| GRUPOS | Número de aves SPF* | Edad (días) | Inmunización | Dosis (UFP/ave) | Desafío (TCID₅₀ ILTV) |
|---------------|----------------------------|--------------------|---|------------------------|---|
| A | 10 | 1 | Baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” | 10 ⁵ | 1.7 x 10 ³ |
| B | 10 | 1 | Baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” | 10 ⁶ | 1.7 x 10 ³ |
| C | 10 | 1 | Baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” | 10 ⁷ | 1.7 x 10 ³ |
| D | 10 | 1 | Baculovirus no recombinante | 10 ⁶ | 1.7 x 10 ³ |
| E | 10 | 1 | - | - | - |
| F | 10 | 1 | - | - | 1.7 x 10 ³ |

*Aves SPF son pollos blancos leghorn (white leghorn chickens) que han sido evaluados serológicamente contra más de 30 patógenos en Charles River Laboratories International Inc. (EE.UU) y cuyos huevos son enviados a nuestros laboratorios y mantenidos bajos los mismos estándares en la Planta de Incubación de Huevos SPF, en FARVET SAC.

La Tabla 2. presenta la descripción detallada del esquema de inmunización y los eventos de la toma de muestra.

Tabla 2. Descripción de eventos para ensayo de inmunización y desafío

| Edad de pollos | Descripción de eventos |
|-----------------------|---|
| 1 día | Toma de sangre (sueros pre-inmunes). Inmunización intranasal |
| 7 días | Toma de sangre para ensayo de ELISA y citometría de flujo |
| 14 días | Toma de sangre para ensayo de ELISA y citometría de flujo. Desafío vía nasal y ocular |
| 21 días | Toma de sangre para ensayo de ELISA y citometría de flujo. Hisopado traqueal. Signos clínicos |

28 días

Toma de sangre para ensayo de ELISA y citometría de flujo. Hisopado traqueal. Signos clínicos

4.3 Evaluaciones de signos clínicos, moleculares, serológicas e inmunológicas.

4.3.1 Signos clínicos

4.3.1.1 Los signos clínicos de las aves evaluadas serán categorizados según la clasificación usada por Fuchs W. y colegas (40).

Puntajes: (0) animales sanos; (1) ligeramente enfermos: jadeos o estornudos, tos ocasional; (2) enfermo: permanente desorden respiratorio, rinitis, aislamiento y aparente estado depresivo del animal; (3) severamente enfermo: marcada disnea, expectoración de mucosa con sangre, pico abierto y marcado estado de cansancio; (4) muerte.

4.3.1.2 Los puntajes serán tomados diariamente por un periodo de 10 días después del desafío para todas las aves de cada grupo.

4.3.2 Evaluación de la carga viral por reacción en cadena de polimerasa (PCR) cuantitativo (qPCR)

4.3.2.1 Los hisopos estériles usados fueron previamente embebidos en PBS para luego ser usados en la toma de muestra traqueal.

4.3.2.2 El ADN viral fue extraído mediante el kit QIAamp MinElute Virus Spin (QIAgen, Alemania) de forma automática en el QIAcube (QIAgen, Alemania).

4.3.2.3 Cada reacción de PCR cuantitativo (qPCR) se realizó en un volumen final de 20 μ L a una concentración de 1x de LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche, Alemania), 0.125 μ M de cada cebador y 5 pg de ADN. El qPCR se realizó en el termociclador LightCycler®480 (Roche, Suiza) y RotorGene-Q (QIAgen, Alemania).

4.3.2.4 La estandarización, preparación de la curva estándar, selección de cebadores y ciclado del protocolo se realizó usando métodos llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica en FARVET SAC y el PCR cualitativo se realizó según Zhao (98).

4.3.3 Evaluación serológica por ELISA

4.3.3.1 Se incubó la muestra de sangre a 37°C por 1 hora para permitir la coagulación de células sanguíneas. Luego se dejó a 4°C por 16 horas y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. El suero obtenido fue guardado a -20°C hasta su uso.

4.3.3.2 La detección de anticuerpos presentes en los sueros de las aves se realizó mediante el kit de ELISA ProFLOK (99) para la detección del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar

(Synbiotics, EE.UU). El ensayo de ELISA se realizó según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, las cuales se redactan a continuación brevemente. Inicialmente se realizó la preparación de las muestras de suero, control negativo y positivo de suero. Para las diluciones de las muestras de suero se agregó 6 μ L de suero en 300 μ L de buffer de dilución (1/50). Los sueros utilizados como controles positivos y negativos fueron proporcionados por el Kit de ELISA, 6 μ L de sueros controles se agregaron a 300 μ L de buffer de dilución (1/50), cada tipo de suero control se evaluó en triplicado. De cada una de estas diluciones se agregó 50 μ L a cada pozo de la placa y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se descartó el sobrenadante de la placa y se lavó con 300 μ L de buffer de lavado tres veces. Se agregó 100 μ L de anticuerpo conjugado a HRP que reconoce IgG de pollo (IgY) a cada pozo de la placa, previa preparación del anticuerpo conjugados (proporcionado por el kit de ELISA): se mezcló 100 μ L de este anticuerpo en 10ml de buffer de dilución. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavó tres veces con 300 μ L de buffer de lavado. Se agregó 100 μ L de la solución de sustrato y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 100 μ L de solución stop y la lectura de placa se

realizó a 405nm. El título de anticuerpo se calculo de la siguiente manera según las instrucciones del fabricante:

$$Sp = \frac{(Abs. \text{ de la muestra} - Abs. \text{ del control negativo})}{(Abs. \text{ del control positivo} - Abs. \text{ del control negativo})}$$

$$Log \text{ Título de anticuerpo} = (1.450 \times LogSp) + 3.726$$

$$\text{Título de anticuerpo} = \text{Antilog. de Log. Título de anticuerpo}$$

4.3.4 Evaluación celular por citometría de flujo

4.3.4.1 La toma de muestra de sangre y el aislamiento de PBMCs se realizó según 3.2.1.

4.3.4.2 Se contaron 1×10^6 células y se marcaron con anticuerpos fluorescentes de ratón conjugados a fluoróforos que reconocen CD41, CD4, CD8 (SouthernBiotech, EE.UU) y CD3, CD45 (USBiological, EE.UU) de pollo y posteriormente fueron incubadas por 30 minutos en oscuridad en 0,1 mL de buffer de tinción (PBS al 10% de SFB en 0,002% NaN₃).

4.3.4.3 Luego las muestras fueron lavadas y resuspendidas en 1mL de buffer de tinción.

4.3.4.4 Al menos 10 000 eventos fueron contados en el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter, EE.UU) y analizados en el programa Kaluza 1.2. (Beckman Coulter). Partiendo de la población CD45+CD41-, se analizaron las poblaciones de células T CD4+ (CD45+CD3+CD4+) y T CD8+ (CD45+CD3+CD8+), las cuales fueron expresadas en porcentajes.

4.4 Datos estadístico

4.4.1 Diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques completamente al azar, siguiendo siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

i = 6 tratamientos

j = 10 repeticiones

Y_{ij} = ij -ésima observación en el i -ésimo bloque en la unidad experimental

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i

β_j = Efecto del j -ésimo bloque

ε_{ij} = Valor aleatorio, error experimental de la unidad experimental i,j

4.4.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Stata (v10, 2007, EE.UU.). Dichos datos fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianza y prueba de normalidad.

- Análisis de varianza (ANOVA) para de poblaciones (conteo) de linfocitos T (citometría de flujo).
- Análisis de varianza (ANOVA) para detección del título de anticuerpos en seropositivos y Fisher Test para el análisis de la proporción de seropositivos (ELISA).
- Analisis no paramétrico Kruskal-Wallis y Dunn Test para la comparación del puntaje (signos clínicos).

Todos estos datos análisis fueron sometidos a una significancia estadística de 5% ($p < 0.05$)

RESULTADOS

1. Componente: Bioinformático

Las secuencias fueron ensambladas *in silico* utilizando el programa bioinformático de acceso libre SNAPGENE® y luego fueron sintetizadas por fragmentos, el ensamblado inicial se muestra en la figura 5. Para esto el fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ” fue sintetizada en el plásmido pUC57, dicha secuencia contiene 4 sitios de reconocimiento de digestión enzimática: EcoRI, HindIII, XbaI y SmaI. Inicialmente los sitios de digestión enzimática EcoRI y HindIII fueron utilizados para clonar la secuencia “Bv-gpJ” en el plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza) (Fig. 6) y posteriormente entre los sitios de restricción de XbaI y SmaI se insertó la secuencia correspondiente al gen que codifica la glicoproteína J o gpJ (fragmento 2), previamente sintetizada en pUC57, (Fig. 7) para finalmente obtener la secuencia “Ch-gpJ”.

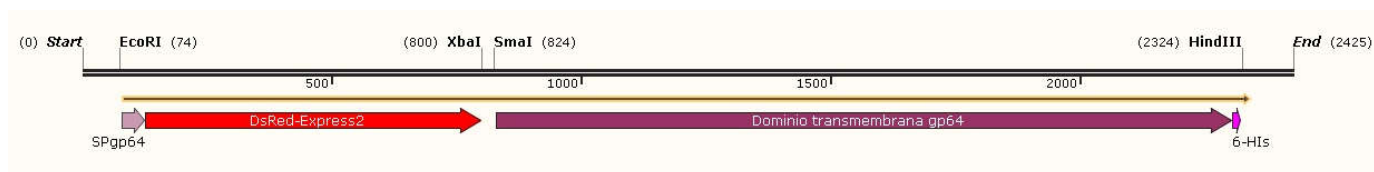


Figura 5. Fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ” ensamblada *in silico* comprende secuencias del péptido señal (SP) de gp64 (color rosado), DsRed2 (color rojo), dominio transmembrana de gp64 (color guinda) y 6x-histidina (color lila)

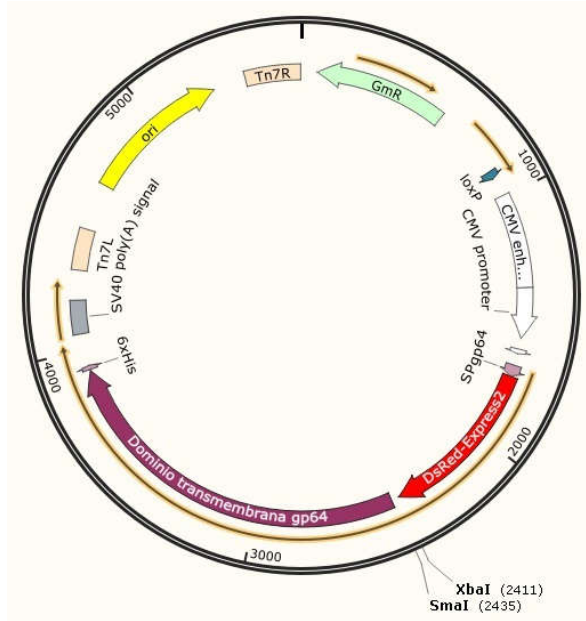


Figura 6. Inserción del fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ” en el plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza)

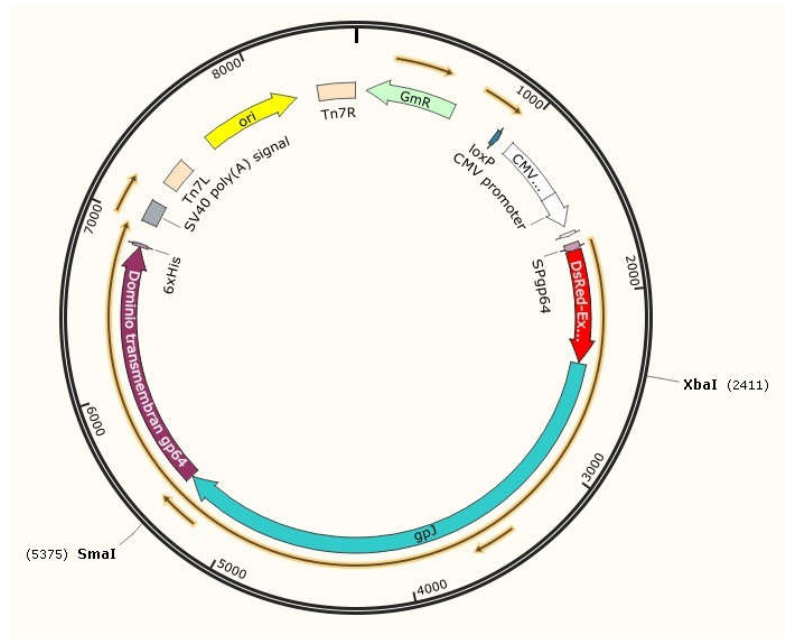


Figura 7. Obtención de “Ch-gpJ” mediante la inserción del fragmento 2 en el plásmido donador que contiene el fragmento 1 de la secuencia “Bv-gpJ”

2. Componente: Sistema de expresión de proteínas en células de insecto (baculovirus)

Después de la obtención del plásmido recombinante “Ch-gpJ” en Laboratorios Genscript (EE.UU), “Ch-gpJ” fue digerido utilizando las enzimas XbaI y SmaI (Fig. 8). Como resultado de la digestión se obtuvo una banda mayor a los 2322 pares de bases (pb) y otra banda mayor a 4361 pb. La banda de menor peso molecular corresponde a la secuencia codificante de gpJ la cual se encuentra flanqueada por los sitios de restricción XbaI y SmaI (Fig. 7).

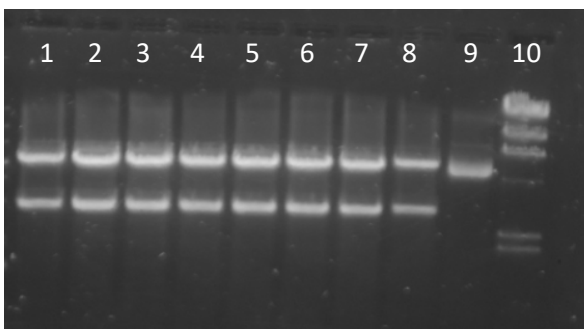


Figura 8. Digestión de plásmido recombinante “Ch-gpJ” con enzimas de restricción XbaI y SmaI. 1-8: plásmidos digeridos. 9: plásmido no digerido. 10: marcador de peso molecular LambdaDNA/HindIII

La transformación/transposición del plásmido recombinante “Ch-gpJ” al báculo que contiene el genoma de baculovirus presente en las células competentes DH10BacVSV (Geneva Biotech, Suiza) se realizó mediante choque térmico obteniéndose clonas que formaron colonias de color blanco y azul. Debido a que la secuencia de reconocimiento para la transposición en el báculo se encuentra presente dentro de la secuencia del péptido de LacZ α , esta quedaría destruida al realizarse correctamente la transposición por lo cual

β -galactosidasa no podría producirse obteniéndose colonias de color blanco. Caso contrario, las colonias de color azul reflejan que no hubo transposición y por lo tanto β -galactosidasa está activa (Fig. 9).

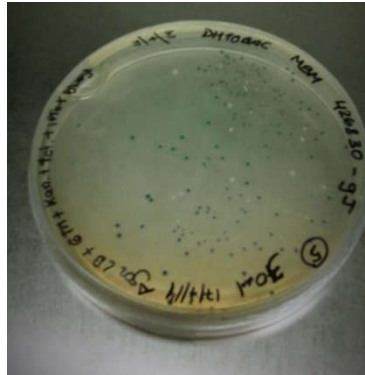


Figura 9. Placa LB agar que contiene colonias recombinantes de color blanco “bácmido-Ch-gpJ”

Para confirmar la presencia del inserto “Bv-gpJ” en el bácmido se diseñaron cebadores que amplificaron 1050 pb del gen que codifica gpJ. El producto obtenido fue secuenciado en Laboratorios Macrogen Inc. (Korea), los resultados de secuenciación confirman la presencia del gen que codifica gpJ (Fig. 10).

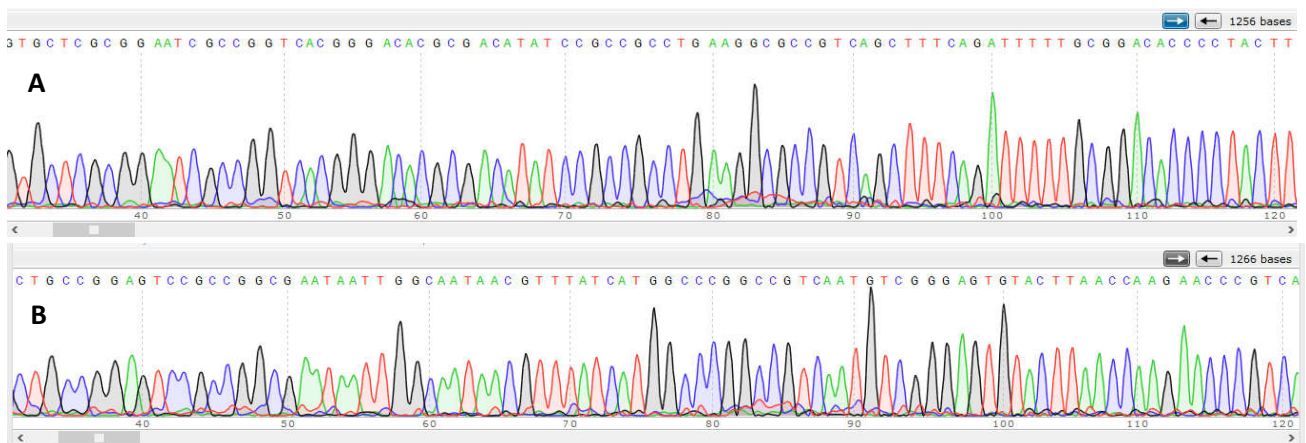


Figura 10. Secuenciamiento de 1050 pb perteneciente al gen que codifica gpJ. **A:** secuenciamiento utilizando el cebador forward. **B:** utilizando el cebador reverse.

La expresión de “Ch-gpJ” se realizó mediante la transfección del báculo recombinate “Ch-Bv-gpJ” en células de insecto Sf9, los resultados de la transfección y amplificación viral como evidencia de la replicación viral fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia a 200X y enfocados a 610nm (Fig. 11).

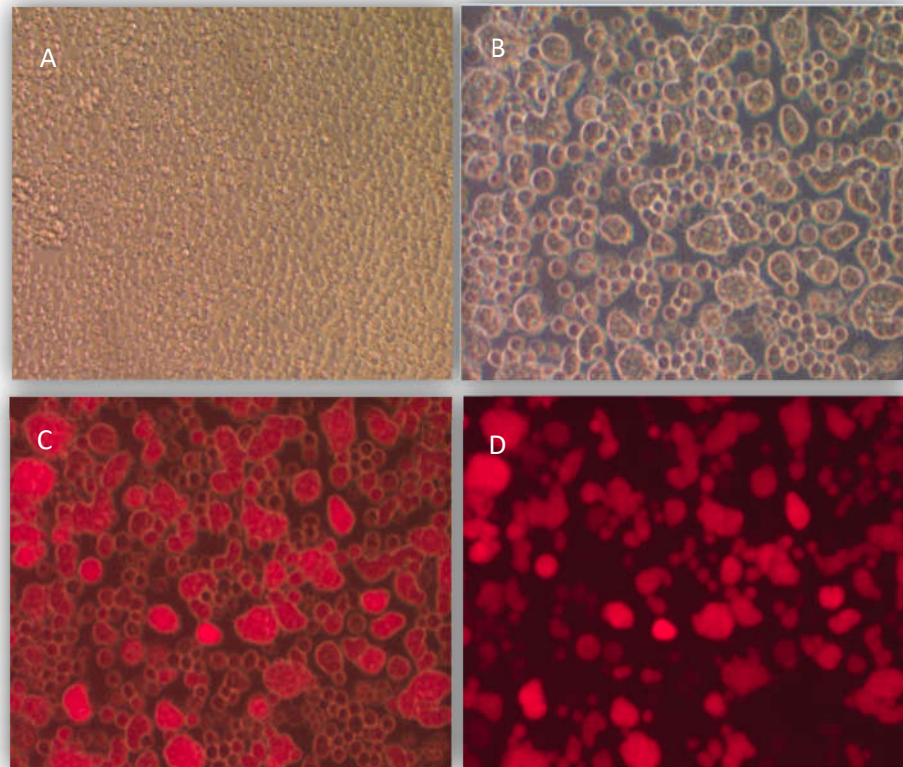


Figura 11. Células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” (4dpi) detectadas mediante microscopía de fluorescencia. A: Células de insecto no infectadas (control negativo). B, C y D: células de insecto infectadas (4dpi). dpi: días pos-infección.

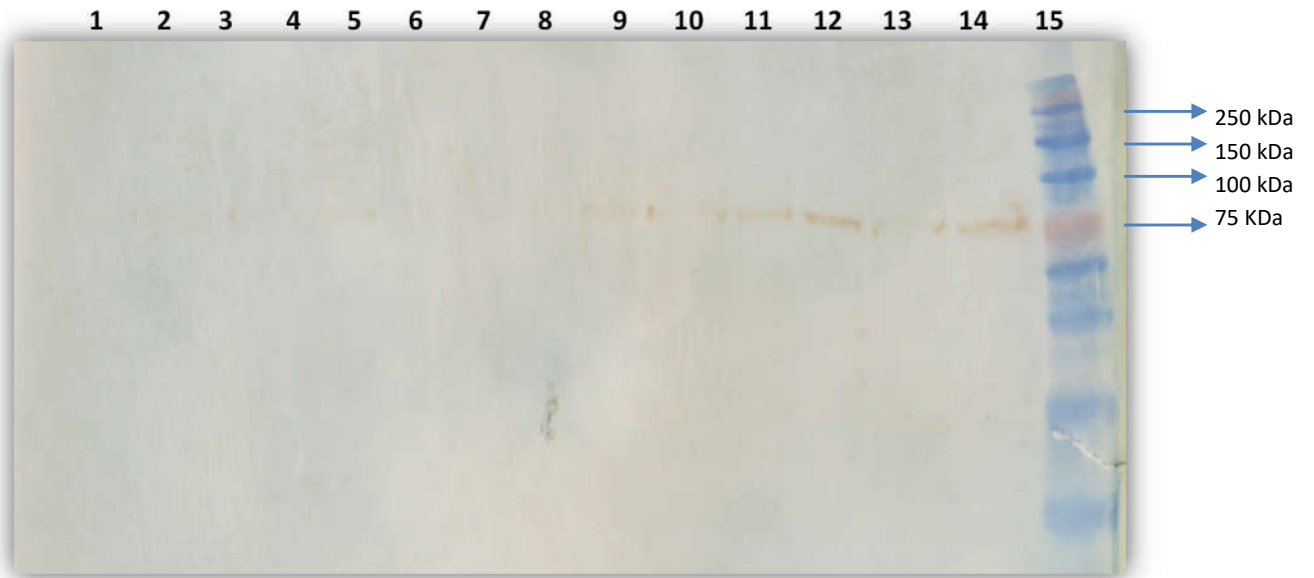
El sobrenadante obtenido de la transfección al cual llamamos P₀ fue utilizado para generar P₃ mediante infecciones consecutivas de células Sf9 para incrementar la cantidad de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”, el cual

luego se tituló mediante ensayo de placa. Después de 10 días se realizó el revelado de la placa usando cristal violeta obteniéndose un valor de 3×10^6 UFP/mL.

Por ensayo de western blot utilizando anticuerpo anti-histidina se detectó una única banda de aproximadamente 75 kDa en las muestras provenientes de resto celular para MOIs de 0.01; 0.05 y 0.1 tanto para el primer y segundo día pos-infección. En las muestras tomadas el tercer, cuarto y sexto día para lisado celular y resto celular no se detectó ninguna banda al igual que en los sobrenadantes ultracentrifugados provenientes de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” (Fig. 12).

Debido a que la secuencia de aminoácidos correspondiente a 6x-histidina se encuentra adyacente al extremo carboxilo del dominio transmembrana (TMD) de gp64 es muy probable que dicho peso corresponda TMDgp64, es por ello que se realizó un ensayo de western blot utilizando anticuerpo de ratón que reconoce a gp64. Se detectó una banda muy tenue de aproximadamente 70 kDa en el primer día pos-infección. Al segundo día pos-infección se detectó una banda del mismo tamaño molecular en el resto celular y sobrenadante de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante. Al tercer y cuarto día pos-infección sólo se detectó una banda en el resto celular de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante (Fig. 13). Estos

resultados confirmaron la expresión de la secuencia “Ch-gpJ” en el cultivo de células de insecto.



| | MOI | dpi | Tipo de muestra |
|-----------|--|------------|------------------------|
| 1 | 0.05 | 4 | Lisado celular |
| 2 | 0.01 | 4 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 3 | 0.1 | 3 | |
| 4 | 0.05 | 3 | Resto celular |
| 5 | 0.01 | 3 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 6 | 0.1 | 3 | |
| 7 | 0.05 | 3 | Lisado celular |
| 8 | 0.01 | 3 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 9 | 0.1 | 2 | |
| 10 | 0.05 | 2 | |
| 11 | 0.01 | 2 | Resto celular |
| 12 | 0.1 | 1 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 13 | 0.05 | 1 | |
| 14 | 0.01 | 1 | |
| 19 | 0.05 | 6 | |
| 20 | 0.1 | 6 | Resto celular |
| 21 | 0.01 | 6 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 22 | 0.1 | 6 | |
| 23 | 0.05 | 6 | Lisado celular |
| 24 | 0.01 | 6 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 25 | 0.1 | 4 | |
| 26 | 0.05 | 4 | Resto celular |
| 27 | 0.01 | 4 | “Ch-Bv-gpJ” |
| 28 | 0.1 | 4 | Lisado celular |
| | | | “Ch-Bv-gpJ” |
| 15 | Marcador de peso molecular (Biorad, EE.UU.) | | |
| 16 | Marcador molecular de 6xhis (Qiagen, Alemania) | | |
| 17 | Sobrenadante ultracentrifugado “Ch-Bv-gpJ” | | |
| 18 | Sobrenadante ultracentrifugado “Ch-Bv-gpJ” | | |
| 29 | Marcador de peso molecular (Biorad, EE.UU.) | | |

MOI: multiplicidad de la infección; dpi: días pos-infección

Figura 12. Detección mediante western blot de la cola de histidina (6x-histidina) presente en la secuencia “Ch-gpJ”. MOI: multiplicidad de la infección. dpi: días pos-infección.

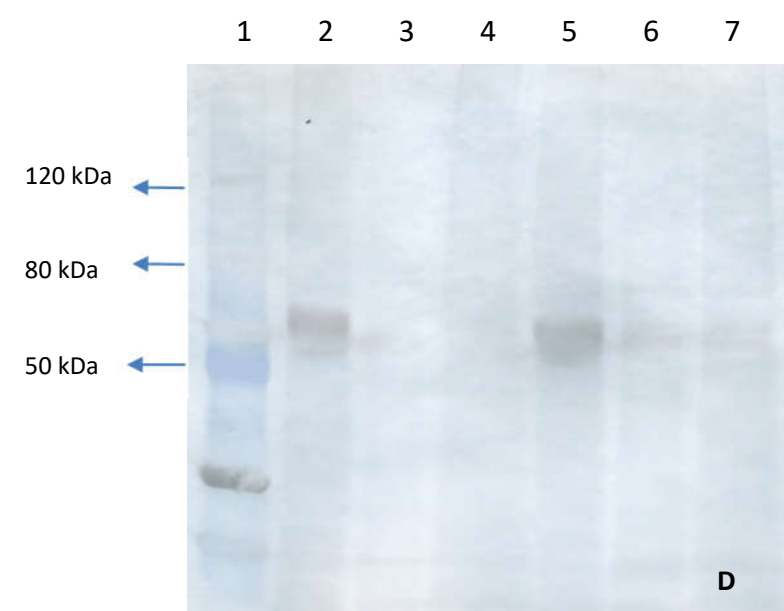
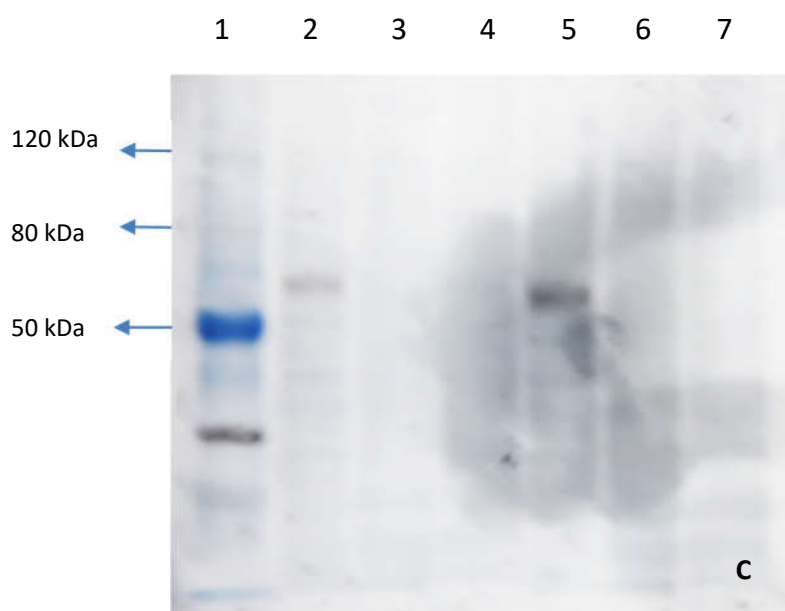
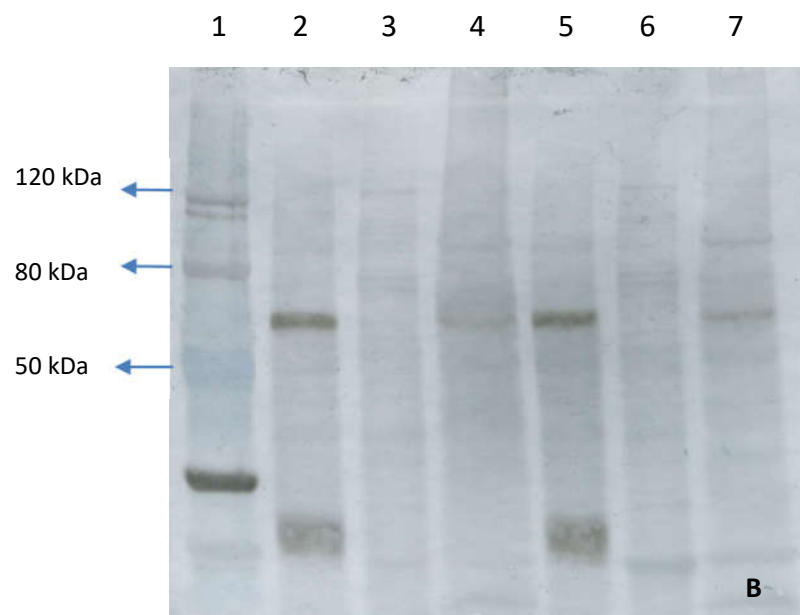
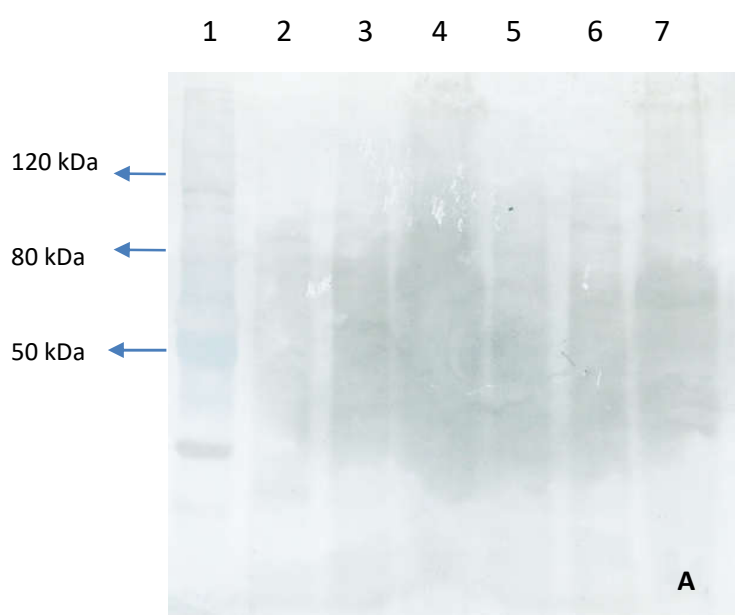


Fig. 13 Detección mediante western blot de gp64 presente en la secuencia “Ch-gpJ”. A: 24 horas pdi. B: 48 horas dpi. C: 72 horas pdi. D: 96 horas dpi. 1: marcador meolecular PAGE MASTER protein standard plus (Genscript, EE.UU). Baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”: 2: resto celular; 3: lisado celular; 4: sobrenadante. Baculovirus no recombinante: 5: resto celular; 6: lisado celular; 7: sobrenadante. dpi: días pos-infección.

El ensayo de inmunofluorescencia directa en células de insecto infectadas con “Ch-Bv-gpJ” permitió detectar regiones de la membrana celular positivas a la presencia de 6xhis (flecha azul) (Fig. 14C). Se detectó también la presencia de la proteína fluorescente mCherry dentro de las células de insecto como evidencia de la replicación de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”. Y se identificaron zonas con mayor intensidad de fluorescencia localizadas en la membrana celular (Fig. 14B).

Asimismo, en la Fig. 14D se observó la co-localización del anticuerpo para la detección de 6x-his (flecha blanca) y la proteína fluorescente mCherry presente en el genoma de baculovirus (flecha violeta). No obstante, la flecha de color amarillo indica la presencia de la proteína fluorescente DsRed2 presente en la secuencia “Ch-gpJ” expresada en la membrana de la célula de insecto debido a que esta fusionada al péptido señal y dominio transmembrana de gp64, cuya intensidad de fluorescencia se detectó en la Fig.14B como regiones de mayor intensidad en la membrana celular (flecha verde). La Fig. 14E y 14F son células de insecto no infectadas.

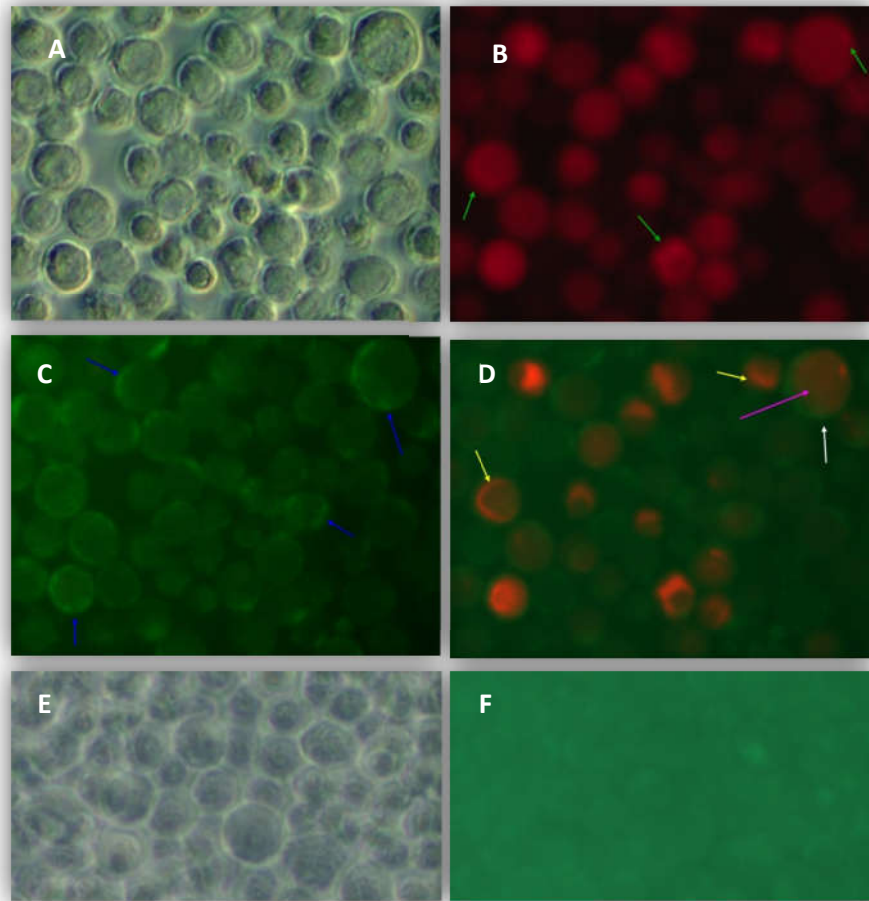


Figura 14. Inmunofluorescencia directa para detección de 6xhis. Células de insecto infectadas con “Ch-Bv-gpJ”: (A) luz visible; (B) mCherry y DsRed2; (C) FITC; (D) mCherry, DsRed2 y FITC. Células de insecto no infectadas (control negativo): (E) luz visible. (F) FITC.

3. Componente: Ensayos serológicos e inmunológicos

3.1 Sero-neutralización del baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”

En el ensayo de seroneutralización las intensidades de fluorescencia relativa (IFR) de A (IFRA) y B (IFRB) fueron expresadas como ratio. Se observó diferencias significativas entre IFRA (diluciones de suero de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar) y IFRB (sueros

de aves SPF) para las diluciones 1/2 y 1/4 ($p=0.0134$ y $p=0.0101$ respectivamente) (Fig. 15). Los anticuerpos presentes en el suero de aves SPF no mostraron afinidad por baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” por lo cual estos lograron infectar las células de insecto obteniéndose una mayor intensidad de fluorescencia relativa siendo esto un indicador de infección viral comparado con los sueros de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar cuyos anticuerpos presentaron afinidad por gpJ reduciendo la infección y obteniendo una menor intensidad de fluorescencia como indicador de inhibición de la infección infiriéndose el reconocimiento de gpJ por los anticuerpos presentes en el suero de aves infectadas con ILTV y demostrando indirectamente la expresión de gpJ en la envoltura viral de baculovirus. Los datos correspondientes a las intensidades de fluorescencia fueron tomados al sexto día pos-infección debido que días previos no se observó diferencias entre los grupos de sueros analizados.

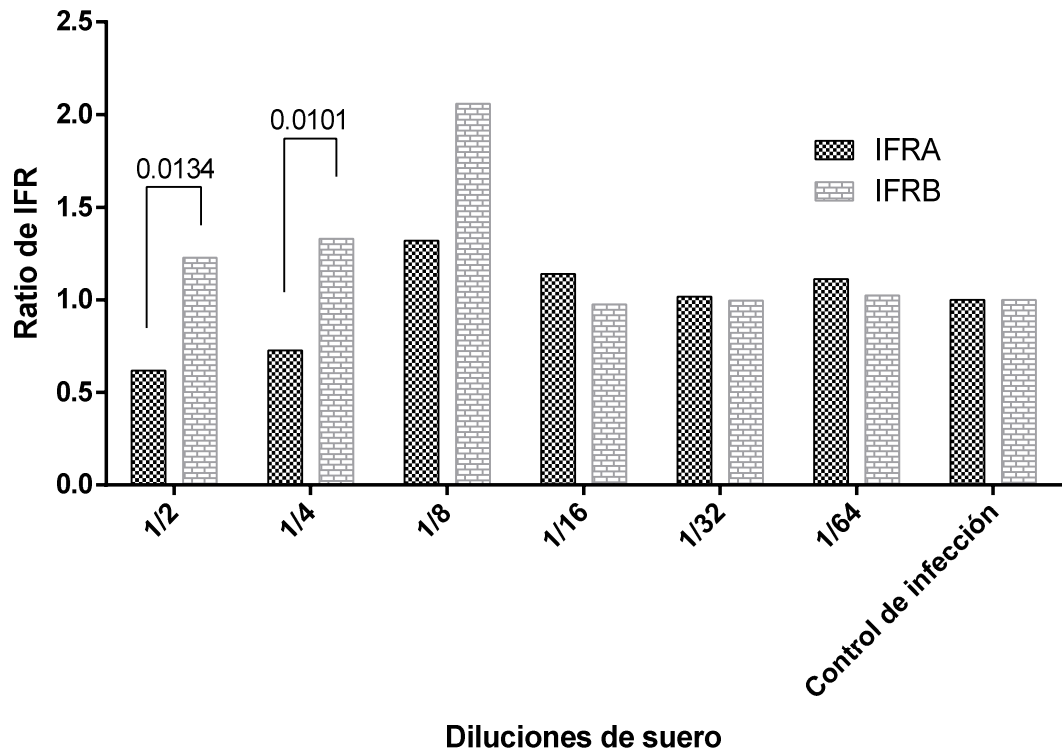


Figura 15. Ensayo de seroneutralización en células de insecto infectadas a MOI de 0.1 de “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante utilizando sueros de aves infectadas con ILTV (A) y suero de aves SPF (B). IFR: intensidad de fluorescencia relativa. Las barras representan medianas. Kruskal-Wallis y Dunn test.

3.2 Detección de chIL12 en PBMCs estimulados *in vitro* con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

La detección de chIL12 como resultado de la estimulación de PBMCs de pollo (no expuestos previamente a ningún antígeno) inducido por la presencia de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” es de vital importancia para evaluar la funcionalidad inmunológica de “Ch-Bv-gpJ” como inmunomodulador en el ave.

Se detectó diferencias significativas en la producción de chIL12 a las 24 horas pos-estimulación utilizando baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y baculovirus no recombinante a MOIs de 0.1 (757 pg/ml y 351.29 pg/ml respectivamente; $p=0.0073$) y 0.2 (735.57 pg/ml y 381.29 pg/ml respectivamente; $p=0.0068$) asimismo se observó un incremento significativo en la producción de IL12 estimulado por baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a las 24 horas pos-estimulación a MOIs de 0.05 y 0.1 correspondiente a 478.43 pg/ml y 757 pg/ml de IL12 respectivamente ($p=0.0429$). También se observó diferencias estadísticas entre el grupo no estimulado con los diferentes MOIs utilizados en presencia de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y no recombinante (Fig. 16 y ANEXO Tabla A5). Estos resultados son evidencia que baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” es capaz de estimular células del sistema inmune y esto apoya y refuerza su uso en posteriores ensayos de inmunización y desafío.

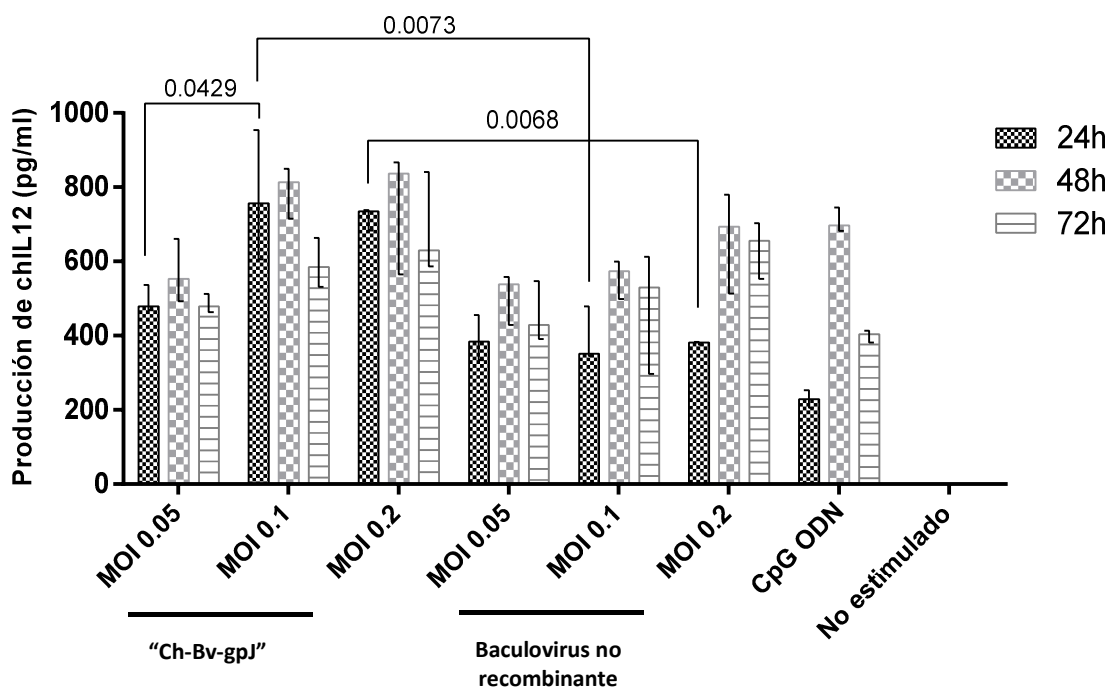


Figura 16. Detección de chIL12 por ensayo de ELISA mediante estimulación con Ch-Bv-gpJ y Baculovirus no recombinante. Las barras representan las medianas y sus rangos. Kruskal-Wallis y Dunn test. CpG ODN (control positivo) a 40 μ M. 24 horas: No estimulado con Ch-Bv-gpJ MOI 0.05 ($p=0.0505$), MOI 0.1 ($p=0.0004$) y MOI 0.2 ($p=0.0006$). 48 horas: No estimulado con Ch-Bv-gpJ: MOI 0.05 ($p=0.0127$), MOI 0.1 ($p=0.0002$) y MOI 0.2 ($p=0.0005$); con baculovirus no recombinante MOI 0.05 ($p=0.0325$), MOI 0.1 ($p=0.0130$) y MOI 0.2 ($p=0.0023$); con CpG ($p=0.0007$). 72 horas: No estimulado con Ch-Bv-gpJ MOI 0.1 ($p=0.0073$) y MOI 0.2 ($p=0.0013$); con baculovirus no recombinante MOI 0.1 ($p=0.0465$) y MOI 0.2 ($p=0.0030$)

4. Componente: Inmunización y desafío

El ensayo de inmunización y desafío se realizó teniendo en cuenta los grupos de vacunación descritos en tabla 5 y el esquema de evaluación de la vacunación presentado en la tabla 6. La dosis de desafío se determinó mediante ensayos de

dosis infectiva media en cultivo celular (TCID₅₀) y se obtuvo $1,7 \times 10^3$ TCID₅₀/mL en un volumen total de 0.3mL.

4.1 Signos clínicos

La evaluación de signos clínicos se dio mediante el análisis de puntaje registrado de forma diaria para cada ave. Las primeras manifestaciones de signos clínicos fueron observadas al quinto día pos-desafío para los grupos A y F mostrando ambos grupos diferencias significativas con el grupo E ($p < 0.02$).

Los signos clínicos empeoraron durante los siguientes días para los grupos A y F, por consiguiente se observó un incremento en el puntaje relacionado con la agudización de los signos clínicos. Al octavo día pos-desafío se registraron diferencias significativas del grupo A con los grupos B, C, D y E ($p < 0.03$) y al noveno día pos-desafío se detectó diferencias significativas del grupo F con los grupos A, B, C, D y E ($p < 0.03$). No se registró diferencias significativas entre los grupos B, C, D y E desde el octavo al décimo tercer día pos-desafío (Tabla 3).

La cinética de desarrollo de los signos clínicos durante los días pos-desafío nos reveló que el grupo F presentó los más altos puntajes de signos clínicos desde el noveno hasta el décimo primer día pos-desafío correspondiente a la manifestación homogénea de signos clínicos de todas las aves en aquel grupo. De la misma manera el grupo A presentó puntajes de signos clínicos los cuales aumentaron gradualmente a lo largo de la evaluación después del

desafío sin embargo estos puntajes fueron inferiores a los reportados para el grupo F. También se identificaron picos de agudización de signos clínicos para los grupos C y D para el sexto y décimo día respectivamente, los cuales se redujeron posteriormente.

Finalmente, los puntajes de signos clínicos registrados para los grupos B y E fueron muy poco frecuentes por lo que estos son los grupos que obtuvieron los más bajos puntajes de signos clínicos. A pesar que el grupo E es el grupo control sin inmunización ni desafío, este grupo registró manifestaciones de signos clínicos a partir del octavo día pos-desafío lo cual se asocia a que las aves se contagiaron y obtuvieron el virus de otras aves desafiadas (Fig. 17).

Tabla 3. Puntajes de signos clínicos evaluados en días posteriores al desafío

| | | SIGNOS CLÍNICOS* (Días pos-desafío) | | | | | | | |
|---------------|--|--|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | | Mediana DE PUNTAJES (Rango) | | | | | | | |
| Grupos | | 5 | 6 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| A | 10 ⁵ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 0.5 (0-2) ^A | 1 (0-2) ^{A,B} | 1 (0-3) ^{A,B,C,D} | 0.5 (0-2) ^{A,B,C} | 1 (0-2) ^A | 1 (0-2) ^{A,E} | 1.5 (0-2) ^{A,B,C,D} | 1 (0-2) ^A |
| B | 10 ⁶ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 0 (0-1) | 0 (0-0) ^{A,C,D} | 0 (0-1) ^{A,E} | 0 (0-1) ^{A,D} | 0 (0-1) ^{A,B,C} | 0 (0-1) ^B | 0 (0-1) ^{A,E} | 0 (0-1) ^B |
| C | 10 ⁷ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 (0-1) ^{B,F} | 0 (0-0) ^{B,E} | 1 (0-1) ^B | 0 (0-1) ^C | 0 (0-0) ^{B,F} | 0 (0-1) ^{A,C} |
| D | 10 ⁶ UFP no recombinante | 0 (0-1) | 1 (0-1) ^{C,E} | 0 (0-0) ^{C,G} | 0 (0-1) ^F | 0 (0-2) ^D | 0 (0-0) ^{D,E} | 0 (0-1) ^{C,G} | 0 (0-1) ^D |
| E | Control no inmunizado ni desafiado | 0 (0-0) ^{A,B} | 0 (0-0) ^{B,E,F} | 0 (0-1) ^{D,H} | 0 (0-1) ^G | 0 (0-1) ^E | 0 (0-1) ^{A,F} | 0 (0-1) ^{D,H} | 0 (0-1) ^E |
| F | Control de desafío | 0.5 (0-1) ^B | 1 (0-2) ^{D,F} | 1 (0-3) ^{E,F,G,H} | 1.5 (1-2) ^{C,D,E,F,G} | 1.5 (0-3) ^{C,D,E} | 1.5 (0-2) ^{B,C,D,F} | 1 (0-2) ^{E,F,G,H} | 1 (0-2) ^{B,C,D,E} |
| | | p<0.02 | p<0.01 | p<0.03 | p<0.046 | p<0.01 | p<0.038 | p<0.01 | p<0.039 |

* 0: saludable; 1: levemente afectado (estornudo, jadeo); 2: conjuntivitis, trastorno respiratorio permanente, rinitis, animales deprimidos; 3: marcada disnea, expectoración de mucosidad sanguinolenta, picos abiertos, animales agotados; 4: muerte.
Kruskal-Wallis, Dunn test: letras superíndice iguales indican diferencias estadísticas en cada columna.

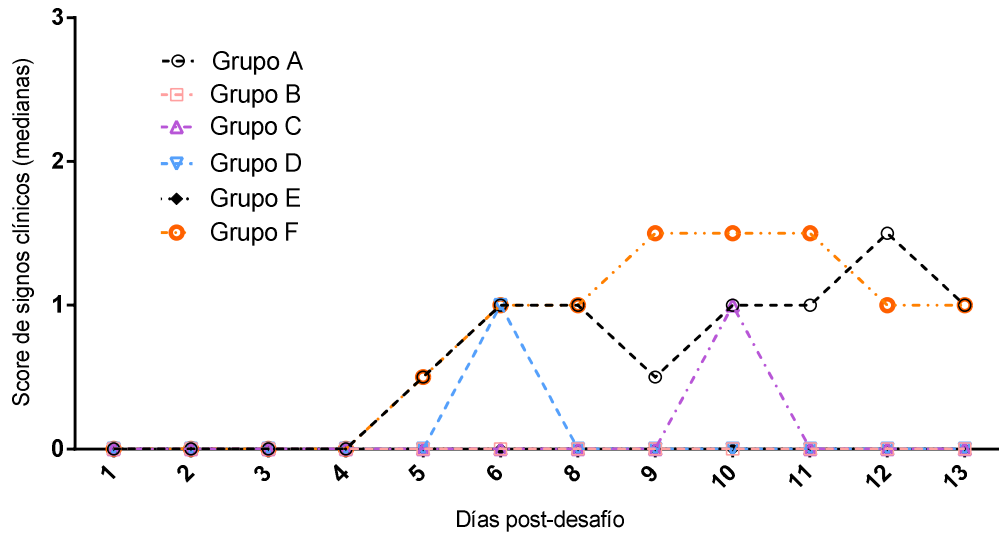


Figura 17. Cinética de desarrollo de signos clínicos después del desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío

4.2 Evaluación de la carga viral por qPCR

El virus de laringotraqueitis infecciosa aviar presenta tropismo por el tejido traqueal motivo por el cual se tomaron muestras de hisopados de dichos órganos después del desafío. Se hicieron grupos (mezcla homogénea de muestras provenientes de cada ave de un mismo grupo) de muestras para cada día por lo cual no se aplicó el análisis estadístico, estas muestras fueron posteriormente evaluadas por qPCR. La carga viral fue expresada como el exponente obtenido del \log_{10} de las copias virales obtenidas por qPCR.

Como control de desafío se tomaron hisopados traqueales al primer día post-desafío, todas las muestras de hisopados traqueales de los grupos de aves

fueron positivas a excepción del grupo E por PCR cualitativo (datos no mostrados).

Las primeras cargas virales en ser detectadas fueron aquellas provenientes de los grupos A y D al segundo día pos-desafío (carga viral = 4 y 3.4 respectivamente). La carga viral perteneciente al grupo A se incrementó gradualmente hasta el noveno día (carga viral=6), posteriormente no se detectó carga viral en tráquea. El grupo D también presentó un incremento de la carga viral gradualmente hasta el quinto día no obstante dicha carga viral no fue detectable a partir del sexto día pos-desafío.

Se detectó carga viral en tráquea en las aves del grupo F a partir del tercer día (carga viral = 5.3) pos-desafío (1 día después que los grupos A y D), luego la carga viral aumento gradualmente hasta el noveno día (carga viral = 5.8), posteriormente se detectó una disminución de la carga viral el décimo tercer día (carga viral = 3.5) siendo la detección de carga viral en el grupo F más prolongada comparada con el grupo A. Para el grupo C sólo se detectó carga viral del tercer al quinto día pos-desafío, posteriormente no se detectó carga viral en tráquea. No se detectó carga viral en el grupo B ni en el grupo E en los días posteriores al desafío (Tabla 4 y Fig. 18).

Tabla 4. Evaluación de la carga viral en tejido traqueal en días posteriores al desafío

| GRUPOS de muestras (Log. copias virales) | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--------------------------------------|
| dpd | A 10 ⁵ UFP "Ch-Bv-gpJ" | B 10 ⁶ UFP "Ch-Bv-gpJ" | C 10 ⁷ UFP "Ch-Bv-gpJ" | D 10 ⁶ UFP no recombinante | E Control no inmunizado ni desafiado | F Control de desafío |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4 | 0 | 0 | 3.4 | 0 | 0 |
| 3 | 5.5 | 0 | 3.7 | 3.8 | 0 | 5.3 |
| 5 | 5.2 | 0 | 4.3 | 4.7 | 0 | 5.4 |
| 6 | 5.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.3 |
| 8 | 5.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.8 |
| 9 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.8 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.5 |

dpd: días pos-desafío.

La carga viral fue expresada como el exponente obtenido del Log₁₀. de las copias virales genómicas obtenidas por qPCR.

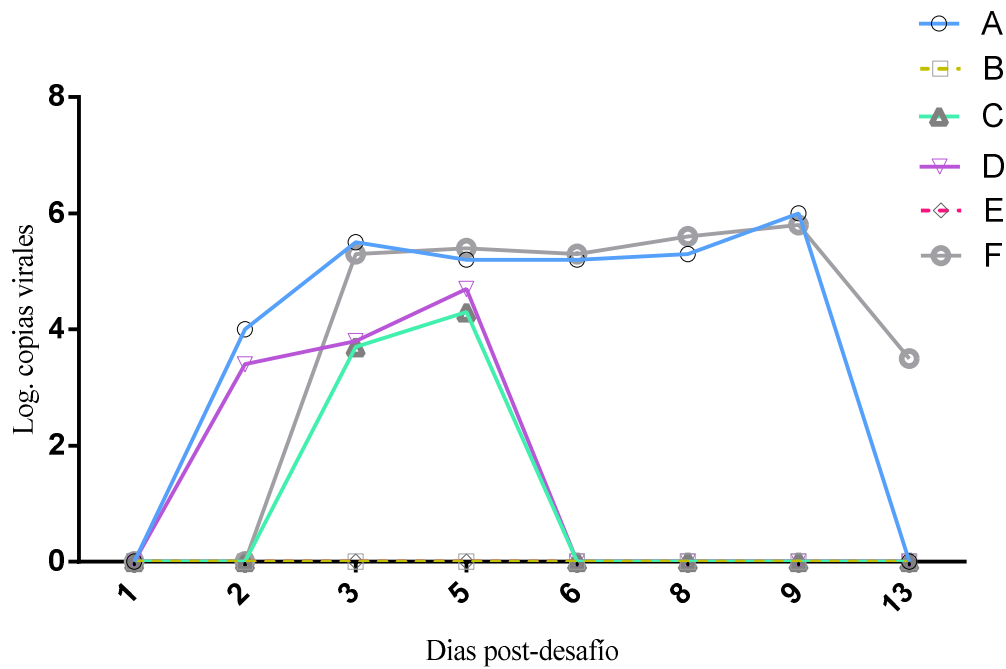


Figura 18. Carga viral en tráquea evaluada los días posteriores al desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío

4.3 Evaluación serológica por ensayo de ELISA

La detección de anticuerpos presente en suero contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar por ensayos de ELISA fue evaluada después de la inmunización y después del desafío. No se detectó título de anticuerpos contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en sueros pre-inmunes (datos no mostrados). Tampoco se detectó título de anticuerpos en los grupos de aves durante 7 días después de la inmunización. A pesar de detectarse título de anticuerpos al décimo cuarto día después de la inmunización en los grupos B, C y D; sólo un individuo

de cada grupo fue seropositivo, dichos títulos de anticuerpos fueron ligeramente más altos que el punto de corte (título de anticuerpo ≤ 340 ; donde valor $SP \leq 0.15$) establecido por el ELISA (ProFLOK, Synbiotics).

El título de anticuerpos incremento considerablemente en los grupos después del desafío. A los siete días después del desafío se detectó altos niveles de anticuerpos en la mayoría de aves pertenecientes a los grupos A y F no detectándose diferencias significativas entre ambos grupos a pesar de observarse mayor dispersión de los títulos de anticuerpos para el grupo F. Los títulos de anticuerpos para los grupos C y D fueron bajos comparados con el grupo A y F sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 5).

Se identificó también diferencias significativas relacionadas al número de aves seropositivas de cada grupo. Tanto el grupo B como el grupo E, en los cuales no se detectó títulos de anticuerpos, fueron significativamente diferentes del grupo A y F en donde la mayoría de aves fueron reportadas como seropositivas. El número de aves seropositivas en los grupos C y D fue marcadamente diferente del grupo F ($p=0.0210$ respectivamente). Todos estos datos nos indican que hay una marcada producción de anticuerpos contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en los grupos A y F como resultado de la exposición de éstos al virus. Para el décimo cuarto día después del desafío se observó un incremento en los títulos de anticuerpo para los grupos A, F y D pero disminuyo el número de individuos seropositivos en el grupo A y F. Se registró también la

seroconversión de un ave en el grupo B y disminución de aves seropositivas en el grupo C. No se detectó diferencias estadísticas relacionadas a los títulos de anticuerpos entre los grupos, pero si se detectó diferencias estadísticas relacionadas al número de aves seropositivas entre los grupos E (no se detectaron títulos de anticuerpos) y F ($p=0.0210$) (Tabla 5).

Estos resultados nos indican que baculovirus (recombinante “Ch-Bv-gpJ” y no recombinante) fue capaz de evitar una temprana exposición de las aves al virus de laringotraqueitis infecciosa aviar motivo por el cual los grupos B, C y D presentaron bajos o nulos títulos de anticuerpos a excepción del grupo A (menor dosis de baculovirus).

Tabla 5. Evaluación del título de anticuerpos en los días después de la inmunización y después del desafío.

| | Grupos | Proporción de Seropositivos (>0.15 SP)* | Media Geométrica del título de anticuerpo de seropositivos (rango) |
|---------------------------------|--------|---|--|
| 7 días pos-inmunización | A | 0/7 | - |
| | B | 0/7 | - |
| | C | 0/7 | - |
| | D | 0/7 | - |
| | E | 0/7 | - |
| | F | 0/7 | - |
| 14 días pos-inmunización | A | 0/7 | - |
| | B | 1/7 | 358 [‡] |
| | C | 1/7 | 569,8 [‡] |
| | D | 1/7 | 651,6 [‡] |
| | E | 0/7 | - |
| | F | 0/7 | - |
| 7 días pos-desafío | A | 6/7 ^{A,B} | 3916,56 (2120-6187) ^A |
| | B | 0/7 ^{A,C} | - |
| | C | 2/7 ^D | 525,6 (482-573) ^A |
| | D | 2/7 ^E | 1070,52 (722-1587) |
| | E | 0/7 ^{B,F} | - |
| | F | 7/7 ^{C,D,E,F} | 2141,56 (625-4190) |
| 14 días pos-desafío | A | 3/7 | 5963,28 (4762-6283) |
| | B | 1/7 | 978,16 [‡] |
| | C | 1/7 | 532,75 [‡] |
| | D | 2/7 | 1179,56 (555-2509) |
| | E | 0/7 ^A | - |
| | F | 5/7 ^A | 2595 (382-5907) |

Grupo A: 10⁵ UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10⁶ UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10⁷ UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10⁶ UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío.

*Según las instrucciones del fabricante (Kit de ELISA ProFLOK, Synbiotics).

[‡] Único título de anticuerpo detectado para ese grupo.

Letras iguales indican diferencias estadísticas. Test de Fisher (proporción de seropositivos) y ANOVA (media de seropositivos) (p<0.05).

4.4 Evaluación de la relación CD4/CD8

Para determinar el perfil inmunológico celular se analizó la relación CD4/CD8 de los linfocitos T los días 7 y 14 pos-inmunización y los días 7 y 14 pos-desafío de cada grupo de aves. Si bien no se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos en los días evaluados, es necesario tener en cuenta las diferencias encontradas en las evaluaciones de los parámetros previamente descritos los cuales nos revelan que hay factores que están siendo estimulados sin embargo estos factores aún deben ser identificados y evaluados para determinar el verdadero rol de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” contra infecciones del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación de la relación CD4/CD8 en los días después de la inmunización y después del desafío.

| GRUPOS | 7 días pos-inmunización | 14 días pos-inmunización | 7 días pos-desafío | 14 días pos-desafío |
|--------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| A | 3.7983 (± 1.44) | 3.8421 (± 1.42) | 4.802 (± 1.72) | 7.179 (± 2.66) |
| B | 4.228 (± 0.88) | 3.9535 (± 1.57) | 4.3843 (± 1.58) | 7.722 (± 2.59) |
| C | 3.4146 (± 0.66) | 3.8767 (± 0.88) | 4.0689 (± 1.09) | 8.557 (± 4.65) |
| D | 3.5928 (± 1.32) | 3.6803 (± 1.14) | 3.6073 (± 0.87) | 7.089 (± 2.23) |
| E | 2.9107 (1.39) | 3.7846 (1.15) | 3.8498 (1.66) | 7.567 (2.95) |
| F | 3.0345 (± 1.15) | 3.4969 (± 0.898) | 3.8403 (± 0.95) | 5.661 (± 0.97) |
| | NS | NS | NS | NS |

NS = efecto estadístico no significativo. Media (\pm D.S.). ANOVA ($p < 0.05$)

Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío.

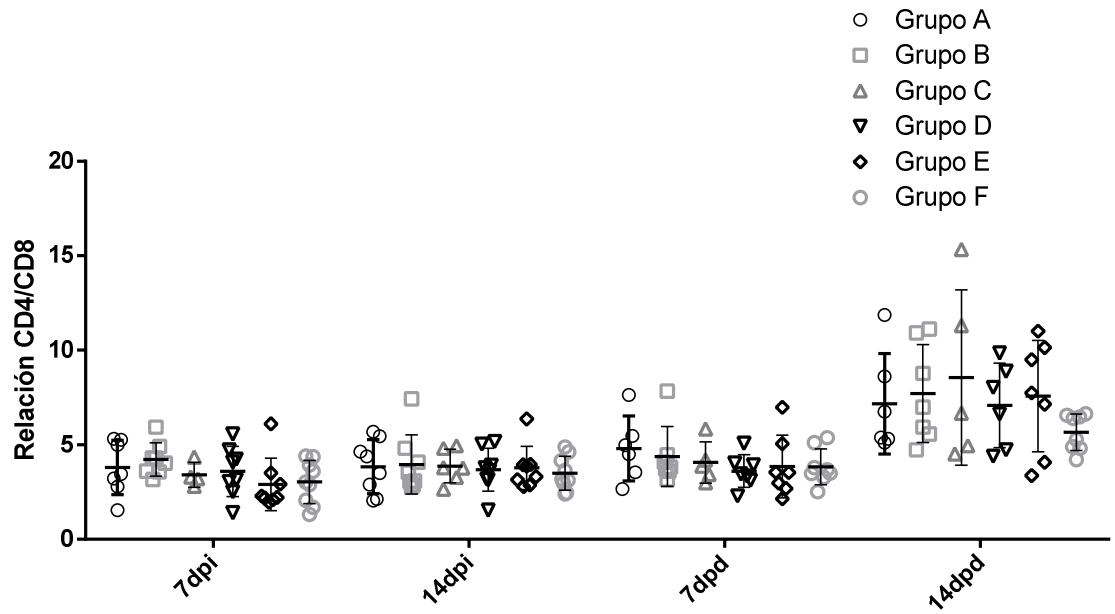


Figura 19. Relación CD4/CD8 en los días posteriores al desafío. Grupo A: 10^5 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo B: 10^6 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo C: 10^7 UFP “Ch-Bv-gpJ”; Grupo D: 10^6 UFP baculovirus no recombinante; Grupo E: grupo control no inmunizado ni desafiado; Grupo F: grupo control de desafío. dpi: días pos-inmunización; dpd: días pos-desafío. Las barras representan medias y desviación estándar.

DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo un baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” que expresa la glicoproteína J del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en su envoltura viral, dicha estrategia ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de potenciales vacunas en donde baculovirus fue empleado como un vehículo presentador de antígenos (61). Esta estrategia no sólo ha sido utilizada para el desarrollo en vacunas contra enfermedades virales en el campo veterinario como son los casos de reovirus aviar (100) y fiebre clásica porcina (86) sino también contra enfermedades infecciosas en humanos como malaria (101).

EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTE “CH-BV-GPJ”

Ensayos comparativos utilizando distintas secuencias de promotores en el sistema de expresión de proteínas en células de insecto Sf9 (77) indican que la expresión de proteínas bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) es débil, pero que el uso de este promotor favorece la fuerte expresión de proteínas en células de fibroblastos de embrión de pollo (77) por lo cual sería ventajoso cuando este sea administrado durante los procesos de inmunización en las aves. En el presente trabajo, en el cual se utilizó el promotor de CMV para la expresión de proteínas, se logró detectar mediante ensayo de Western blot la presencia de 6x-histidina en muestras de restos celulares provenientes de células infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

La detección de 6x-histidina en restos celulares provenientes de lisados de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” se debe a la presencia del péptido señal de gp64 (84) en la secuencia “Ch-gpJ” el cual permite la translocación

de dicha secuencia a la membrana de la célula de insecto (79, 102) permitiendo finalmente la expresión de “Ch-gpJ” en la membrana infectada con baculovirus lo cual también se corroboró mediante la identificación de una banda del mismo peso molecular cuando se utilizó anticuerpos que reconocen a gp64 por ensayos western blot en muestras de restos celulares. Además, los ensayos de inmunofluorescencia directa realizados en el presente trabajo también confirman la expresión de la secuencia “Ch-gpJ” en la membrana de la célula de insecto infectada con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” al igual que estudios previos que emplearon la misma estrategia de obtención de baculovirus recombinante (79, 87, 100, 103-106).

De otro lado, la ausencia de banda reactiva en ensayos de western blot utilizando sobrenadantes concentrados por ultracentrifugación provenientes de un volumen de 50mL de cultivo de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” nos indica la necesidad por el uso de métodos más sofisticados que permitan la concentración de mayores volúmenes de cultivos en corto tiempo como el uso de filtración por flujo tangencial empleado previamente para la concentración de sobrenadantes a partir de 1 litro de cultivo de células de insecto (107) siendo el uso de este método en forma conjunta con procesos de ultracentrifugación ideales para la concentración y posterior identificación por western blot de 6x-histidina presente en baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

ENSAYOS SEROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS

Si bien la técnica de western blot no permitió la identificación de la glicoproteína J a partir de sobrenadante de cultivo de células de insecto infectadas con baculovirus

recombinante “Ch-Bv-gpJ”, los ensayos de seroneutralización empleando: sueros policlonales provenientes de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar, sueros de aves SPF, cultivos celulares de insecto infectados con baculovirus recombinante y no recombinante nos permitieron identificar de manera indirecta la expresión de gpJ en la envoltura viral de baculovirus mediante la evaluación de la capacidad de los sueros de inhibir la replicación del baculovirus recombinante mediante el reconocimiento de la glicoproteína J por parte de los sueros policlonales de aves infectadas evitando de esta forma la replicación de baculovirus y por tanto reduciendo los niveles de fluorescencia asociados con su replicación en los cultivos celulares de insecto.

El uso de sueros provenientes de aves infectadas experimental y naturalmente con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar ha sido previamente reportado por su capacidad de identificar de manera particular a la glicoproteína J debido a la presencia de anticuerpos que reconocen a dicha glicoproteína (41) es por ello que la reducción en la intensidad de fluorescencia observada en diluciones de suero de las aves a diluciones de 1/2 y 1/4 provenientes de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar causada por la afinidad del suero policlonal por la gpJ comparado con diluciones de suero de 1/2 y 1/4 proveniente de sueros de las aves SPF nos indicó que los anticuerpos presentes en el suero policlonal fueron capaces de neutralizar al baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y por ende se observó una inhibición en la infección caracterizada por la reducción en la fluorescencia relativa detectada (Fig. 15). No obstante, el uso de otras técnicas que permitan la detección directa de gpJ en la

envoltura viral de baculovirus como microscopía electrónica serían ideales, pero la falta de anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles hizo imposible su uso en el presente trabajo.

En el genoma de baculovirus se ha reportado que la presencia de CpG no metilados le confieren a éste la característica como agente inmunomodulador del sistema inmune (76) es por ello que en este trabajo se empleó como control positivo de estimulación *in vitro* la secuencia sintética de CpG ODN previamente reportada como estimulador de la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica no sólo de aves (76, 96, 108) sino también de humanos (109). La inmunología aviar es un campo que presenta limitada información sobre las células efectoras y moléculas que participan durante la respuesta inmune en aves; sin embargo se sabe que en humanos los monocitos/macrófagos presentan receptores TLR (110) en su membrana celular capaces de detectar e interactuar con CpG para finalmente estimular la producción de la citoquina IL12 (111, 112).

La presencia de chIL12 ha sido asociada con protección de las aves frente a desafíos con virus patógenos letales, así un estudio previo reportó que pollos de dos días de edad inmunizados con baculovirus no recombinante lograron altos porcentajes de sobrevivencia frente al virus de bronquitis infecciosa aviar (IBV) (75) y un estudio posterior reportó la expresión de mRNA de chIL12 y TLR21 medidos por qPCR en la línea de macrófagos aviares HD11 estimulados con CpG ODN y baculovirus; ante estas evidencias se demostraría la relación entre la aplicación de baculovirus y la producción de IL12 en las aves (76). Según los resultados obtenidos en el presente trabajo se infiere

que el uso del baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a MOI a 0.1 y 0.2 estimularon la producción de chIL12 (proteínas) en células mononucleares de sangre periférica de aves siendo esta producción significativamente diferente a la estimulación utilizando baculovirus no recombinante, corroborando lo reportado en estudios previos (75, 76). A pesar de la información limitada disponible sobre gpJ, con los resultados obtenidos en el presente estudio se infiere que esta proteína participaría en sinergia con la propiedad adyuvante de baculovirus observándose una mayor producción de chIL12 comparado con la producción obtenida por baculovirus no recombinante, dicha potenciación estaría dada por el reconocimiento de ésta por las células inmunes del ave dado a su alta inmunogenicidad previamente descrita (41), sin embargo futuros estudios dirigidos a glicoproteína J son requeridos para corroborar estos resultados.

ENSAYO DE INMUNIZACIÓN Y DESAFÍO

El análisis y evaluación de parámetros como signos clínicos, carga viral en tráqueas, producción de anticuerpos y relación CD4/CD8 nos ayudó a entender y evaluar la actividad *in vivo* de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

Desde el punto de vista veterinario los signos clínicos son el principal parámetro a determinar si una vacuna confiere protección ante un desafío, puesto que la presencia de aves infectadas en un galpón es considerada como un potencial foco infeccioso debido a que la transmisión de ave - ave, le confiere una mayor virulencia al virus de laringotraqueitis infecciosa aviar (55). Por ello un excelente candidato a vacuna es aquel que presentaría la capacidad de reducir y/o eliminar los niveles de replicación

viral en los tejidos traqueales (tejido diana para la infección viral) evitando sí la transmisión horizontal entre aves.

Debido a que se observó pérdidas de aves en algunos grupos durante los primeros días del ensayo asociadas al propio manejo de aves en incubadora, se homogenizó la cantidad de aves por grupos (se evaluó 7 aves por grupo) a evaluar en los posteriores análisis. Durante el presente trabajo las primeras manifestaciones de signos clínicos se observaron al quinto día pos-desafío en los grupos A (dosis 10^5 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y F (grupo control de desafío) agravándose durante el octavo y noveno día pos-desafío respectivamente siendo estas diferencias marcadas en comparación con a los demás grupos (Tabla 3), y no se observaron manifestaciones de signos clínicos en las aves de los grupos B (dosis 10^6 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y E (grupo control no inmunizado ni desafiado) durante los días pos-desafío. A pesar que hay estudios donde señalan que las primeras manifestaciones de signos clínicos se observaron a los cinco días pos-desafío, se debe tener en cuenta distintos factores en el ave como la edad, linaje, y el título viral de la cepa de desafío que podrían alterar el desarrollo de los signos clínicos (113-115). Otro factor a tener en cuenta es la ruta de inoculación de la cepa de desafío que podría influenciar en la aparición de signos clínicos. La inoculación intra-traqueal utilizada para el desafío en aves SPF previamente inmunizadas con vacunas vectorizadas reportó la aparición de signos clínicos al segundo día pos-desafío (113) comparado con las primeras manifestaciones reportadas el quinto día pos-desafío en el presente estudio. No obstante, es necesario mencionar que la cavidad nasal como la conjuntiva y la glándula

de Harder junto a la tráquea son los más expuestos al virus durante la infección por la inhalación del aerosol de gotas con el virus (116) motivo por el cual la ruta de inoculación usada en el presente estudio fue la vía nasal-ocular siendo estas rutas de inoculación también usadas por otros estudios (114, 116).

Ensayos de qPCR fueron utilizados para la detección de ADN genómico del ILTV, en donde la detección de una mayor cantidad de ADN genómico viral en tráquea se interpreta como una mayor carga viral y por tanto una replicación viral activa en la tráquea. Para lo cual, la toma de hisopados traqueales se realizó por cada grupo experimental seguida de la mezcla homogénea de muestras provenientes de cada ave de un mismo grupo. El impacto del factor dilución se toma en consideración en aquellas muestras con baja carga viral que se pudieron haber diluido por lo cual dichas cargas virales no fueron detectadas por los cebadores específicos empleados en la qPCR; no obstante, esto implica que aquellos grupos que fueron positivos por qPCR, teniendo en cuenta este factor dilución, presentarían altas cargas virales producto de una activa replicación viral en tráquea.

Las más altas cargas virales fueron detectadas a partir del tercer día pos-desafío para los grupos A (dosis 10^5 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y F (grupo control de desafío) manteniéndose estas altas cargas virales constantes hasta el noveno día pos-desafío, siendo este día en el cual se observó también marcadas manifestaciones de signos clínicos para los grupos A y F. Debido a que los signos clínicos son reportados por primera vez a partir del quinto día pos-desafío se infiere que la manifestación de signos clínicos es una consecuencia de la replicación viral por

lo cual queda por investigar el mecanismo por el cual el baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” estaría contribuyendo en la inhibición de la replicación viral en la tráquea en los B (dosis 10^6 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y E (grupo control no inmunizado ni desafiado) en los cuales no se detectó carga viral en los días pos-desafío.

El mecanismo de evasión del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar sobre su huésped ha sido asociado a la presencia de proteínas virales secretadas (glicoproteína G) que presentan afinidad por quimioquinas e inclinan la respuesta hacia la producción de anticuerpos (respuesta humoral) permitiendo la replicación del virus en los tejidos producto de una anulación de la respuesta celular adecuada (38, 39, 50), este mecanismo no es único del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar sino también está presente en otros alphaherpesvirus. Esto corroboraría lo reportado en estudios previos en donde la respuesta inmune protectora contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar no está asociada a una respuesta humoral puesto que aves bursectomizadas son capaces de controlar la infección en tráquea (47) y que la transmisión pasiva de suero de aves hiperinmunes contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar no exonera al ave receptora de la manifestación de signos clínicos propios de la enfermedad (46).

Teniendo todo esto en cuenta es necesario resaltar que los grupos A (dosis 10^5 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y F (grupo control de desafío) además de presentar manifestaciones marcadas de signos clínicos y las más altas cargas virales en tráquea, también fueron los grupos en los cuales se detectaron una mayor producción de anticuerpos en días pos-desafío. Mientras que un panorama diferente fue lo ocurrido en los grupos B (dosis 10^6 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y E (grupo

control no inmunizado ni desafiado), en los cuales no se detectó producción de anticuerpos, tampoco signos clínicos y no se detectó ADN viral en los hisopados traqueales.

Esto hace que nos preguntemos sobre el rol que realmente cumpliría la producción de anticuerpos para el caso del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar. Algunos estudios reportan que la producción de anticuerpos no es necesariamente una evidencia de una respuesta inmune protectora y esto viene siendo reportado para otros patógenos que ocasionan patologías en humanos. Estudios científicos basados en la evaluación de la respuesta humoral y celular de vacunas candidatas contra el virus de dengue (DENV) revelan que ratones AG129 (carentes de receptores de IFN del tipo I y II), altamente sensibles a DENV, fueron inoculados con células T, B y suero de ratones silvestres previamente inmunizados con vectores virales portadores de antígenos de DENV (DENV2 E85-VRP), posteriormente los ratones AG129 fueron desafiados con la cepa DENV2. Sólo los ratones inoculados con células T fueron capaces de reducir la carga viral (117). Si bien en el presente estudio la producción de anticuerpos no representa una respuesta inmune protectora, se requiere de la evaluación de otros parámetros que nos permitan comprender y entender el mecanismo de acción del antígeno ensayado.

Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en la evaluación de la relación CD4/CD8 entre los grupos evaluados en este estudio, es también importante considerar la evaluación de las células pertenecientes a la inmunidad innata como primera línea de defensa frente a patógenos. Un estudio previo, reportó el importante rol de la presencia de macrófagos en los senos subcapsulares (SCS) de los nódulos linfáticos

para evitar la vulnerabilidad de éste a la infección causada por el virus de estomatitis vesicular neurotrópico (VSV). La infección de VSV en ratones μ MT (carentes de anticuerpos y presentan tejido linfoide anormal), ratones D_H LMP2A (presentan células β y tejido linfoide normal pero no expresan en su membrana ni secretan anticuerpos) y ratones silvestres permitió demostrar que a pesar que los ratones D_H LMP2A no producen anticuerpos neutralizantes éstos fueron protegidos al igual que los silvestres observándose 60% de mortalidad en ratones μ MT. Además, la presencia de $LT\alpha\beta$ en la membrana de células β permite mantener el fenotipo de macrófagos SCS en el nódulo linfoide siendo estos capaces de producir IFN-I frente a la infección por VSV previniendo la neuro-invasión viral (118).

Estos estudios científicos demuestran que la protección frente a estos patógenos no necesitó de la producción de anticuerpos para asegurar la sobrevivencia de los ratones involucrados en los ensayos. Más aún, Moseman E. y colaboradores resaltan estos resultados como evidencia que la inmunidad innata no sólo es aquella que ayuda a montar la respuesta antiviral del sistema inmune adaptativo, sino que es capaz de detener la invasión viral sin contribución del sistema inmune adaptativo (118).

En este estudio, no detectamos producción de anticuerpo ni diferencias en la relación CD4/CD8 de células T de los grupos B (dosis 10^6 UFP baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”) y E (grupo control no inmunizado ni desafiado) con el resto de grupos, esto enfatiza la necesidad por la incorporación de evaluaciones que permitan la comprensión del mecanismo de acción de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”

Dado que no se observaron diferencias entre las relaciones CD4/CD8 de la presente tesis, se enfatiza el uso de marcadores de activación para linfocitos T que permitan determinar las diferencias en la expresión de éstas y la detección intracelular de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ e IL12) en las células blanco que vienen siendo estimuladas por la presencia de un baculovirus recombinante. Esto debido a que estas citoquinas modulan la respuesta Th1 mediante el reclutamiento y activación de células del sistema inmune y son de gran importancia para la prevención de infecciones virales (119). La falta de disponibilidad de anticuerpos dirigidos a CD69 específicos para aves es una limitante que debe ser resuelto para futuros estudios que tengan por objetivo la identificación de linfocitos T activados. Mientras que para la identificación y medición de citoquinas intracelulares se emplean técnicas moleculares de qPCR en líneas de macrófagos de aves (HD11) estimuladas por baculovirus no recombinante, encontrándose niveles mayores de mRNA pos-estimulación (75), por lo que esta técnica sería ideal para ampliar nuestros resultados.

La dosis 10^6 UFP de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” utilizado para la inmunización del grupo B demostró a través de las diferentes evaluaciones de los parámetros ser la dosis capaz de eliminar la replicación viral en tráquea y por generar una respuesta inmune efectiva, además de comportarse como el grupo E (grupo control no inmunizado ni desafiado). Por el contrario, la dosis 10^5 UFP de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” utilizado para la inmunización del grupo A demostró no ser suficiente para reducir la replicación viral puesto que se detectó carga viral en tráquea al igual que el grupo F (grupo control de desafío). Resultados similares han

sido reportados en estudios previos en donde el porcentaje de sobrevivencia posterior al desafío con el virus de bronquitis infecciosa aviar fue dependiente de la dosis de baculovirus utilizado en la inmunización (75). Sin embargo, la dosis 10^7 UFP de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” merece especial atención y futuras evaluaciones son requeridas para entender el comportamiento e impacto de una alta dosis de baculovirus en la inmunización; no obstante, otro estudio reportó que el uso de la dosis 5×10^7 UFP de baculovirus no recombinante no fue capaz de eliminar la replicación viral en bursa del virus de enfermedad infecciosa de bursa aviar usado como patógeno de desafío (120).

Trabajos científicos publicados en el desarrollo de vacunas en el campo avícola señalan a la inmunidad innata como una respuesta inicial capaz de limitar y prevenir la infección dando tiempo al sistema inmune adaptativo a montar su respuesta (120, 121). Baculovirus ha sido reportado como inmuno-estimulador de la respuesta inmune innata *in vivo* en pollos por ser capaz de estimular la producción de IFN- γ en suero y estimular la expresión de IFN- γ , IL-6 entre otras citoquinas en el bazo a 3 horas pos-inoculación de baculovirus no recombinante en aves; así como también estimular el aumento en la expresión de TLR21 mediante el cual estaría actuando baculovirus. Además, demostraron que baculovirus tiene la propiedad de producir cambios en el perfil celular del sistema inmune dependiente del tipo de tejido a analizar (76, 121).

Chimeno y colegas reportaron la reducción del título viral del virus de la enfermedad infecciosa de bursa (IBDV), obtenida mediante ensayos de TCID₅₀, en la bursa de Fabricio provenientes de aves inoculados con baculovirus no recombinante 3 horas

después de ser infectados con IBDV. La reducción del título viral comparado con las aves que fueron inoculadas sólo con IBDV revela la capacidad de baculovirus de estimular el sistema inmune y de generar un efecto antiviral (120). Dicha reducción de la replicación viral también fue observada en el presente estudio en los grupos B y C que fueron inmunizados con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” y en el grupo D inmunizados con baculovirus no recombinante demostrando que baculovirus *per se* tiene la capacidad de estimular el sistema inmune del ave previniendo la replicación viral y el desarrollo de signos clínicos. Esta propiedad inmunomoduladora de baculovirus también fue observada en este trabajo durante los ensayos de estimulación *in vitro* de PBMC en donde tanto baculovirus no recombinante como baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” fueron capaces de estimular la producción de ChIL-12 siendo esta producción estadísticamente mayor para los PBMCs estimulados con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

Nuestros resultados al igual que estudios previos demuestran que baculovirus presentaría propiedades como agente adyuvante y como tal tiene la capacidad de estimular el sistema inmune del ave. Esta propiedad como inmunomodulador de células del sistema inmune de aves a tempranas horas pos-inmunización enfatizan el uso de baculovirus como estimulador de la inmunidad innata y se hacen necesarios estudios relacionados con la identificación de los blancos de dicha estimulación.

Debido a la temprana estimulación inducida por baculovirus, vacunas desarrolladas en base a este sistema pueden evocar protección en aves recién nacidas en contraste con las actuales vacunas vectorizadas, las cuales han sido asociadas a respuestas inmunes

protectivas tardías (48), presentando una ventaja de baculovirus sobre las vacunas vectorizadas presentes en el mercado actual

Finalmente, no se debe descartar la evaluación de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en combinación con vacunas vectorizadas las cuales han sido asociadas a la inducción de respuestas inmunes tardías en aves y que el uso de baculovirus como agente adyuvante y estimulador de la inmunidad innata puede mantener la inmunidad innata activa durante el tiempo que tome a las vacunas vectorizadas montar una respuesta inmune protectora. Sin embargo, se requieren de ensayos y evaluaciones futuras para determinar el rol que estaría cumpliendo baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” en aves infectadas frente a desafíos con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.

Ensayos complementarios son requeridos para corroborar los resultados del presente estudio en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” corroborado mediante ensayos de western blot y ensayos de inmunofluorescencia directa por detección de 6x-histidina en la membrana de células de insecto infectadas con “Ch-Bv-gpJ”.
- Se redujo la intensidad de fluorescencia relativa de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” como resultado de la inhibición de la replicación viral debido al reconocimiento de gpJ en la envoltura viral de baculovirus por el suero policlonal de aves infectadas con el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar.
- Se estimuló la producción *in vitro* de chIL12 en células mononucleares de sangre periférica de aves utilizando baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” a MOIs de 0.1 y 0.2
- Se redujo la carga viral del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en tráqueas de aves SPF inmunizadas con la dosis de 10^6 UFP de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ”.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de microscopía electrónica mediante el uso de anticuerpos específicos que permitan la detección y localización de la glicoproteína viral de ILTV “gpJ” en la envoltura viral de baculovirus.
- Se recomienda el uso de marcadores de activación de linfocitos T para determinar si estas células se activan de manera diferencial en los grupos experimentales según la dosis de baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” empleada.
- Se recomienda la identificación intracelular de citoquinas producidas ante la estimulación con baculovirus recombinante “Ch-Bv-gpJ” mediante técnicas moleculares de qPCR.
- Se recomienda realizar ensayos de inmunización y desafío con pollos comerciales con el fin de hacer reproducible y confirmar los resultados obtenidos con pollos SPF.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. May H, Tittsler R. Tracheo-laryngotracheitis in poultry. *Journal of American Veterinarian Medical Association*. 1925;67:229-31.
2. Gwatkin R. Some notes on avian diphtheria. *Ontario Veterinary College Report*. 1925:54-61.
3. Van Hellsbergen T. *Handbuch der Geflügelkrankheiten und der Gelhigelzucht*. Stuttgart: Ferdinand Enke; 1929. 262-4 p.
4. Seddon H, Hart L. The occurrence of I.L.T. in New South Wales. *Australian Veterinary Journal*. 1935;11:212-22.
5. Magnusson H. En ny honssjukdom (Inf. Inflaryngotrakeit). *Skand Vet-Tidskr*. 1940;30:629-31.
6. Marek K. Zakazny laryngotracheitis kur. *Medycyna. Weterynaryjna*. 1948;4:767-70.
7. Rislakki V. Case Report. Infectious Laryngotracheitis of Poultry in Finland. *Avian diseases*. 1965;9(3):339-43.
8. Jordan F. Are view of the literatura on Infectious Laryngotracheitis (ILT). *Avian diseases*. 1966;10(1):1-26.
9. Hipólito O, Soares L, Pereira O, Pinto A, Bottino J, editors. Isolamento e identificação do vírus da Laringotraqueite infecciosa das galinhas no Brasil. *Congresso Brasileiro de Microbiologia*; 1974; Rio de Janeiro, Brasil.
10. Chacon J, Brandão P, Villarreal L, Gama N, Ferreira A. Survey of infectious laryngotracheitis outbreak in layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2007;9(1):61-7.
11. Preis I, Braga J, Couto R, Brasil B, Martins N, Ecco R. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken in Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2013;33(5):591-6.
12. Yauris G, Icochea E, González R, Falcón N. Evidencia serológica de anticuerpos contra el virus de laringotraqueitis infecciosa aviar en gallinas reproductoras de carne y postura. *Rev Inv Vet Peru*. 2008;19(2):3.
13. SENASA. Plan para la Prevención Control y Erradicación de la Laringotraqueitis Infecciosa Aviar en el Perú Lima.2015. Available from: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/legislacion-3/>.
14. SENASA. Reportes-epidemiologicos-semanales Lima2015. Available from: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/reportes-epidemiologicos-semanales/>
15. Alvarado J, Icochea E, Reyna P, Angulo C, Zegarra R. Impacto económico de Laringotraqueitis infecciosa en una granja de ponedoras en Lima, Perú. *Rev investig vet Perú* 2013;24(1).
16. López L, Icochea E, Reyna P, Angulo C, Zegarra R. Impacto Económico de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar en una Granja de Pollos de Carne en Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 2015;26(4):6.
17. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*. 2010;143(1):52-69.
18. Cruickshank JG, Berry DM, Hay B. The fine structure of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*. 1963;20:376-8.

19. Watrach AM, Hanson LE, Watrach MA. The Structure of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Virology*. 1963;21:601-8.
20. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *Journal of virology*. 2001;75(8):3675-84.
21. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology*. 2002;76(4):1537-47.
22. Mahmoudian A, Markham PF, Noormohammadi AH, Browning GF. Kinetics of transcription of infectious laryngotracheitis virus genes. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2012;35(2):103-15.
23. Prideaux CT, Kongsuwan K, Johnson MA, Sheppard M, Fahey KJ. Infectious laryngotracheitis virus growth, DNA replication, and protein synthesis. *Archives of virology*. 1992;123(1-2):181-92.
24. Bagust TJ, Jones RC, Guy JS. Avian infectious laryngotracheitis. *Revue scientifique et technique*. 2000;19(2):483-92.
25. Parra SHS, Nuñez LFN, Ferreira AJP. Epidemiology of Avian Infectious Laryngotracheitis with Special Focus to South America: an update. *Rev Bras Cienc Avic* 2016;18(4).
26. Fuchs W, Veits J, Helferich D, Granzow H, Teifke JP, Mettenleiter TC. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary research*. 2007;38(2):261-79.
27. Leib DA, Bradbury JM, Hart CA, McCarthy K. Genome isomerism in two alphaherpesviruses: Herpesvirus saimiri-1 (Herpesvirus tamarinus) and avian infectious laryngotracheitis virus. Brief report. *Archives of virology*. 1987;93(3-4):287-94.
28. Johnson MA, Prideaux CT, Kongsuwan K, Sheppard M, Fahey KJ. Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. *Archives of virology*. 1991;119(3-4):181-98.
29. Lee SW, Markham PF, Markham JF, Petermann I, Noormohammadi AH, Browning GF, et al. First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. *BMC genomics*. 2011;12:197.
30. Ziemann K, Mettenleiter TC, Fuchs W. Gene arrangement within the unique long genome region of infectious laryngotracheitis virus is distinct from that of other alphaherpesviruses. *Journal of virology*. 1998;72(1):847-52.
31. Veits J, Mettenleiter TC, Fuchs W. Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 6):1415-25.
32. Ziemann K, Mettenleiter TC, Fuchs W. Infectious laryngotracheitis herpesvirus expresses a related pair of unique nuclear proteins which are encoded by split genes located at the right end of the UL genome region. *Journal of virology*. 1998;72(8):6867-74.
33. Chang PC, Chen KT, Shien JH, Shieh HK. Expression of infectious laryngotracheitis virus glycoproteins in *Escherichia coli* and their application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian diseases*. 2002;46(3):570-80.

34. York JJ, Fahey KJ. Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Archives of virology*. 1990;115(3-4):289-97.
35. York JJ, Sonza S, Fahey KJ. Immunogenic glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Virology*. 1987;161(2):340-7.
36. Pavlova SP, Veits J, Blohm U, Maresch C, Mettenleiter TC, Fuchs W. In vitro and in vivo characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus. *The Journal of general virology*. 2010;91(Pt 4):847-57.
37. Poulsen DJ, Keeler CL, Jr. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. *The Journal of general virology*. 1997;78 (Pt 11):2945-51.
38. Devlin JM, Browning GF, Gilkerson JR. A glycoprotein I- and glycoprotein E-deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells. *Archives of virology*. 2006;151(7):1281-9.
39. Coppo MJ, Hartley CA, Devlin JM. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. *Developmental and comparative immunology*. 2013;41(3):454-62.
40. Fuchs W, Wiesner D, Veits J, Teifke JP, Mettenleiter TC. In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs. *Journal of virology*. 2005;79(2):705-16.
41. Veits J, Kollner B, Teifke JP, Granzow H, Mettenleiter TC, Fuchs W. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus. *Avian diseases*. 2003;47(2):330-42.
42. Mundt A, Mundt E, Hogan RJ, Garcia M. Glycoprotein J of infectious laryngotracheitis virus is required for efficient egress of infectious virions from cells. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 11):2586-9.
43. Davison F, Kaspers B, Schat K. *Avian Immunology*. London: Academic Press Elsevier; 2008.
44. Lowenthal JW, Bean AG, Kogut MH. What's so special about chicken immunology? Preface. *Developmental and comparative immunology*. 2013;41(3):307-9.
45. Chang T, Rheins M, Winter A. The Significance of the Bursa of Fabricius in Antibody Production in Chickens: 1. Age of Chickens. *Poultry Science*. 1957;36(4):3.
46. Fahey KJ, Bagust TJ, York JJ. Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken: the role of humoral antibody in immunity to a graded challenge infection. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 1983;12(4):505-14.
47. Fahey KJ, York JJ. The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *The Journal of general virology*. 1990;71(10):2401-5.
48. Vagnozzi A, Zavala G, Riblet SM, Mundt A, García M. Protection induced by commercially available liveattenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathology*. 2012;41(1):10.

49. Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci.* 1998;77(7):972-7.
50. Devlin JM, Viejo-Borbolla A, Browning GF, Noormohammadi AH, Gilkerson JR, Alcamí A, et al. Evaluation of immunological responses to a glycoprotein G deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine.* 2010;28(5):1325-32.
51. Keeler CL, Jr., Hazel JW, Hastings JE, Rosenberger JK. Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryngotracheitis virus. *Avian diseases.* 1993;37(2):418-26.
52. Gelenczei EF, Marty EW. Strain Stability and Immunologic Characteristics of a Tissue-Culture-Modified Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian diseases.* 1965;9(1):44-56.
53. Andreasen JRJ, Glisson JR, Villegas P. Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns. *Avian diseases.* 1990;34(3):646-56.
54. Guy JS, Barnes HJ, Morgan LM. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian diseases.* 1990;34(1):106-13.
55. Guy JS, Barnes HJ, Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian diseases.* 1991;35(2):348-55.
56. Lee SW, Markham PF, Coppo MJ, Legione AR, Markham JF, Noormohammadi AH, et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science.* 2012;337(6091):188.
57. Lee SW, Devlin JM, Markham JF, Noormohammadi AH, Browning GF, Ficorilli NP, et al. Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of multiple past recombination events between infectious laryngotracheitis viruses. *PloS one.* 2013;8(2):e55121.
58. Garcia M, Volkening J, Riblet S, Spatz S. Genomic sequence analysis of the United States infectious laryngotracheitis vaccine strains chicken embryo origin (CEO) and tissue culture origin (TCO). *Virology.* 2013;440(1):64-74.
59. Boyle DB, Heine HG. Recombinant fowlpox virus vaccines for poultry. *Immunology and cell biology.* 1993;71 (Pt 5):391-7.
60. Esaki M, Noland L, Eddins T, Godoy A, Saeki S, Saitoh S, et al. Safety and efficacy of a turkey herpesvirus vector laryngotracheitis vaccine for chickens. *Avian diseases.* 2013;57(2):192-8.
61. Lin SY, Chung YC, Hu YC. Update on baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vaccine antigens. *Expert review of vaccines.* 2014;13(12):1501-21.
62. Tong GZ, Zhang SJ, Wang L, Qiu HJ, Wang YF, Wang M. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian pathology : journal of the WVPA.* 2001;30(2):143-8.
63. Hruby DE. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clinical microbiology reviews.* 1990;3(2):153-70.

64. Morgan R, Gelb J, Schreurs CS, Sondermeijer PJA. Protection of Chickens from Newcastle and Marek's Diseases with a Recombinant Herpesvirus of Turkeys Vaccine Expressing the Newcastle Disease Virus Fusion Protein. *Avian diseases*. 1992;36(4).
65. Souza AP, Haut L, Reyes-Sandoval A, Pinto AR. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2005;38(4):509-22.
66. Barhoom S, Forgacs A, Solyom F. Development of an inactivated vaccine against infectious laryngotracheitis (ILT)--serological and protection studies. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 1986;15(2):213-21.
67. Guy J, Garcia M. Infectious laryngotracheitis virus. In: Y. S, J. G, A F, L M, L N, L S, editors. *Diseases of poultry*. 12 ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2008.
68. Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Developmental and comparative immunology*. 2000;24(2-3):103-19.
69. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*. 1997;9(1):4-9.
70. Genovese KJ, He H, Swaggerty CL, Kogut MH. The avian heterophil. *Developmental and comparative immunology*. 2013;41(3):334-40.
71. St Paul M, Brisbin JT, Abdul-Careem MF, Sharif S. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013;152(3-4):191-9.
72. Keestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, van Putten JP. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental and comparative immunology*. 2013;41(3):316-23.
73. St Paul M, Mallick AI, Read LR, Villanueva AI, Parvizi P, Abdul-Careem MF, et al. Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens. *Vaccine*. 2012;30(30):4524-31.
74. Barjesteh N, Behboudi S, Brisbin JT, Villanueva AI, Nagy E, Sharif S. TLR ligands induce antiviral responses in chicken macrophages. *PloS one*. 2014;9(8):e105713.
75. Niu M, Han Y, Li W. Baculovirus up-regulates antiviral systems and induces protection against infectious bronchitis virus challenge in neonatal chicken. *International immunopharmacology*. 2008;8(12):1609-15.
76. Han Y, Niu M, An L, Li W. Involvement of TLR21 in baculovirus-induced interleukin-12 gene expression in avian macrophage-like cell line HD11. *Veterinary microbiology*. 2010;144(1-2):75-81.
77. He F, Ho Y, Yu L, Kwang J. WSSV ie1 promoter is more efficient than CMV promoter to express H5 hemagglutinin from influenza virus in baculovirus as a chicken vaccine. *BMC Microbiol*. 2008;8:238.
78. Grabherr R, Ernst W, Oker-Blom C, Jones I. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends in biotechnology*. 2001;19(6):231-6.

79. Meng T, Kolpe AB, Kiener TK, Chow VT, Kwang J. Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in mice. *PloS one*. 2011;6(7):e21757.
80. Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of virology*. 1996;70(7):4607-16.
81. Wu C, Wang S. A pH-sensitive heparin-binding sequence from Baculovirus gp64 protein is important for binding to mammalian cells but not to Sf9 insect cells. *Journal of virology*. 2012;86(1):484-91.
82. Kataoka C, Kaname Y, Taguwa S, Abe T, Fukuhara T, Tani H, et al. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *Journal of virology*. 2012;86(5):2610-20.
83. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*. 2005;23(5):567-75.
84. Pidre ML, Ferrelli ML, Haase S, Romanowski V. Baculovirus Display: A Novel Tool for Vaccination. *Biochemistry GaMB*, editor2013.
85. Xu XG, Chiou MT, Zhang YM, Tong DW, Hu JH, Zhang MT, et al. Baculovirus surface display of E(rns) envelope glycoprotein of classical swine fever virus. *Journal of virological methods*. 2008;153(2):149-55.
86. Xu XG, Liu HJ. Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine*. 2008;26(43):5455-60.
87. Xu XG, Wang ZS, Zhang Q, Li ZC, Zhao HN, Li W, et al. Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models. *Vaccine*. 2011;29(4):636-43.
88. Yoshida S, Kawasaki M, Hariguchi N, Hirota K, Matsumoto M. A baculovirus dual expression system-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice. *Infection and immunity*. 2009;77(5):1782-9.
89. Thiry E, Meurens F, Muylkens B, McVoy M, Gogev S, Thiry J, et al. Recombination in alphaherpesviruses. *Reviews in medical virology*. 2005;15(2):89-103.
90. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
91. Barry GF. A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*. 1988;71(1):75-84.
92. Murhammer D. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*: Humana Press; 2007.
93. Technologies L. Growth and maintenance of insect cell lines 2002. Available from: http://wolfson.huji.ac.il/expression/insect/insect_man.pdf.
94. Technologies L. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 2015. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.

95. Sung LY, Chen CL, Lin SY, Li KC, Yeh CL, Chen GY, et al. Efficient gene delivery into cell lines and stem cells using baculovirus. *Nature protocols*. 2014;9(8):1882-99.
96. He H, Crippen TL, Farnell MB, Kogut MH. Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells. *Developmental and comparative immunology*. 2003;27(6-7):621-7.
97. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938;27(3):4.
98. Zhao Y, Kong C, Cui X, Cui H, Shi X, Zhang X, et al. Detection of infectious laryngotracheitis virus by real-time PCR in naturally and experimentally infected chickens. *PloS one*. 2013;8(6):e67598.
99. Synbiotics C. Fowl Laryngotracheitis virus antibody test kit ProFLOK Kansas City. Available from: [https://www.zoetisus.com/contact/pages/product_information/msds_pi/pi/proflok_lt_chicken .pdf](https://www.zoetisus.com/contact/pages/product_information/msds_pi/pi/proflok_lt_chicken.pdf).
100. Lin YH, Lee LH, Shih WL, Hu YC, Liu HJ. Baculovirus surface display of sigmaC and sigmaB proteins of avian reovirus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine*. 2008;26(50):6361-7.
101. Mlambo G, Kumar N, Yoshida S. Functional immunogenicity of baculovirus expressing Pfs25, a human malaria transmission-blocking vaccine candidate antigen. *Vaccine*. 2010;28(43):7025-9.
102. Haase S, Ferrelli L, Pidre ML, Romanowski V. *Genetic Engineering of Baculoviruses 2013*.
103. Feng Q, Liu Y, Qu X, Deng H, Ding M, Lau TL, et al. Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models. *DNA and cell biology*. 2006;25(12):668-73.
104. Xu XG, Tong DW, Chiou MT, Hsieh YC, Shih WL, Chang CD, et al. Baculovirus surface display of NS3 nonstructural protein of classical swine fever virus. *Journal of virological methods*. 2009;159(2):259-64.
105. Xu XG, Wang ZS, Zhang Q, Li ZC, Ding L, Li W, et al. Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: baculovirus virions displaying simultaneously GP5 glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2. *Journal of virological methods*. 2012;179(2):359-66.
106. Yang DG, Chung YC, Lai YK, Lai CW, Liu HJ, Hu YC. Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(5):989-96.
107. Strauss R, Huser A, Ni S, Tuve S, Kiviat N, Sow PS, et al. Baculovirus-based vaccination vectors allow for efficient induction of immune responses against plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(1):193-202.
108. He H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide

- induction in chicken peripheral blood monocytes. *Molecular immunology*. 2007;44(12):3234-42.
109. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(4):249-58.
 110. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112(4):935-45.
 111. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(2):133-46.
 112. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *Journal of immunology*. 2001;166(1):249-55.
 113. Chen HY, Zhang HY, Li XS, Cui BA, Wang SJ, Geng JW, et al. Interleukin-18-mediated enhancement of the protective effect of an infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B plasmid DNA vaccine in chickens. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(Pt 1):110-6.
 114. Coppo MJ, Noormohammadi AH, Hartley CA, Gilkerson JR, Browning GF, Devlin JM. Comparative in vivo safety and efficacy of a glycoprotein G-deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus delivered via eye drop. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2011;40(4):411-7.
 115. Kirkpatrick NC, Mahmoudian A, Colson CA, Devlin JM, Noormohammadi AH. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol*. 2006;35(6):5.
 116. Beltran G, Williams SM, Zavala G, Guy JS, Garcia M. The route of inoculation dictates the replication patterns of the infectious laryngotracheitis virus (ILTV) pathogenic strain and chicken embryo origin (CEO) vaccine. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2017:1-9.
 117. Zellweger RM, Miller R, Eddy WE, White LJ, Johnston RE, Shresta S. Role of humoral versus cellular responses induced by a protective dengue vaccine candidate. *PLoS pathogens*. 2013;9(10):e1003723.
 118. Moseman EA, Iannacone M, Bosurgi L, Tonti E, Chevrier N, Tumanov A, et al. B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. *Immunity*. 2012;36(3):415-26.
 119. Guo P, Thomas JD, Bruce MP, Hinton TM, Bean AG, Lowenthal JW. The chicken TH1 response: potential therapeutic applications of ChIFN-gamma. *Developmental and comparative immunology*. 2013;41(3):389-96.
 120. Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Lucero MS, Richetta M, Gomez E, et al. Immunomodulatory effect of baculovirus in chickens: How it modifies the immune response against infectious bursal disease virus. *Antiviral research*. 2016;131:35-9.
 121. Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gomez E, Gravisaco MJ, Carrillo E, Berinstein A. Modulation of innate immunity in chickens induced by in vivo administration of baculovirus. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012;145(1-2):241-7.

ANEXO

Tabla A1. Referencia de genes de inserto (Bv-gpJ)

| Genes | Código GenBank | Referencia |
|----------------|-----------------------|---|
| SPgp64 | M25420.1 | Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 63 (3), 1393-1399 (1989). |
| DsRed | FJ226077 | A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. Nat. Methods 5 (11), 955-957 (2008) |
| gpJ | JX104561.1 | Analysis of glycoproteins of HLJ0507 strain. Avian Infectious Disease. 25-MAY-2012. |
| TMDgp64 | M25420.1 | Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 63 (3), 1393-1399 (1989). |

Tabla A2. Secuencia nucleotídica de genes del inserto (Bv-gpJ):

| Genes | Secuencia nucleotídica |
|---------------|--|
| SPgp64 | ATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCG |
| DsRed2 | ATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGT GCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGC GAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGC AGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCC CCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGA CATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGG AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCA GGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCA TCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACT CTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGT GCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGCGGC CACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGT |

| | |
|------------|---|
| | GAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCT CCCACAACGAGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGA GGCCCGCCACCACCTGTTCCAG |
| gpJ | ATGGGGACAATGTTAGTGTTGCGCCTTTTCCTACTTGCAGTAGCGGAC GCGGCGTTGCCGACCGGCAGATTCTGCCGAGTTTGAAGGTGCCTCC GGGAGGAACCATCCAAGAGAACCTGGCGGTGCTCGCGGAATCGCCG GTCACGGGACACGCGACATATCCGCCGCCTGAAGGCGCCGTCAGCTT TCAGATTTTTGCGGACACCCCTACTTTGCGCATTGCTACGGCGCTAC GGAGGACGAACTTGCCTGGAGCGCGGGACGTCCGCCTCAGACGCG GACAACGTGACATTTTCGCTGTCATATCGCCCGCGCCAGAAATTCA CGGAGCATACTTCACCATAGGGGTATTCGCTACTGGCCAGAGCACGG AAAGCAGCTATTCGGTCATCAGTCGGGTCTTAGTTAACGCCTCTCTGG AACGGTCCGTGCGCCTGGAAACGCCGTGCGATGAAAATTTTTTGCAG AACGAGCCTACACGGGGCTCGAAGCGTTGGTTAGGCCCCCGTCGCC TTATGTGCGAGATAACGATGTCGCCGTGTTGACAAAAGCGCAGTACA TTGGGGAGTGCTACTCCAACCTCGGCGGCCAGACGGGGCTCACGTCT CTCAACATGACCTTTTTCTATTGCTAAAAGAATAGTAAACGTCACG TGGACAACCGGCGGCCCTCCCCCTCGCGCATAACGGTATACTCGTC GCGGGAGAACGGGCAGCCCGTGTTGAGGAACGTTTCTGACGGGTTCT TGGTTAAGTACACTCCCGACATTGACGGCCGGGCCATGATAAACGTT ATTGCCAATTATTCGCCGGCGGACTCCGGCAGCGTCTCGCGTTTACG GCCTTTAGGGAAGGAAAACCTCCATCCGTGATTCAACTGCACCGGAT AGATATGTCCGGGACTGAGCCGCCGGGACTGAAACGACCTTCGACT GTCAAAAAATGATAGAAACCCCGTACCGAGCGCTCGGGAGCAATGTT CCCAGGGACGACTCTATCCGTCCGGGGGCCACTCTGCCTCCGTTTCA TACCGCAGCACCTGATTTGATACAGGTAATCCCCGACCCCCACTAC CGTGCCAGAGCCAGCCATTACTACACTCATAACCGCGCAGCACTAGCG ATATGGGATTCTTCTCCACGGCACGTGCTACCGGATCAGAACTCTTT CGGTGCCCGTCCAGGAAACGGATAGAACTCTTTCGACAACTCCTCTT ACCCTTCCACTGACTCCCGGTGAGTCAGAAAATACACTGTTTCCTACG ACCGCGCCGGGGATTTCTACCGAGACCCCGAGCGCGGCACATGAAAC TACACAGACCCAGAGTGCAGAAACGGTGGTCTTTACTCAGAGTCCGA |

GTACCGAGTCGGAAACCGCGCGGTCCCAGAGTCAGGAACCGTGGTAT
TTTACTCAGACTCCGAGTACTGAACAGGCGGCTCTTACTCAGACGCA
GATCGCAGAAACGGAGGCGTTGTTTACTCAGACTCCGAGTGCTGAAC
AGATGACTTTTACTCAGACTCCGGGTGCAGAAACCGAGGCACCTGCC
CAGACCCCGAGCACGATACCCGAGATATTTACTCAGTCTCGTAGCAC
GCCCCCGAAACCGCTCGCGCTCCGAGCGCGGGCGCCGGAGGTTTTTA
CACAGAGTTCGAGTACGGTAACGGAGGTGTTTACTCAGACCCCGAGC
ACGGTGCCGAAAACACTACTCTGAGTTCGAGTACTGAACCGGCGATTTT
TACTCGGACTCAGAGCGCGGGAACAGGCCTTTACTCAGACTTCGA
GTGCCGAGCCGGACACTATGCGAACTCAGAGTACTGAAACACACTTT
TTCACTCAGGCCCGAGTACGGTGCCGAAAGCTACTCAGACTCCGAG
TACAGAGCCGGAGGTGTTGACTCAGAGTCCGAGTACCGAACCTGTGC
CTTTCACCCGGACTCTGGGCGCAGAGCCGGAATTACTCAGACCCCG
AGCGCGGCACCCGGAGGTTTATACTCGGAGTTCGAGTACGATGCCAGA
AACTGCACAGAGCACACCCCTGGCCTCGCAAACCCCTACCAGTTCGG
GAACCGGGACGCATAATACTGAACCGAGGACTTATCCAGTGCAAAC
GACACCACATAACCAGAAACTCTACACAGAAAATAAGACTTTATCGT
TTCCTACTGTTGTTTCAGAATTCCATGAGATGTCGACGGCAGAGTCGC
AGACGCCCTATTGGACGTCAAATTTGTAGAGGTGAAGTTTTCAAAC
GATGGCGAAGTAACGGCGACTTGCGTTTTCCACCGTCAAATCTCCCTA
TAGGGTAGAACTAATTGGAAAGTAGACCTCGTAGATGTAATGGATG
AAATTTCTGGGAACAGTCCCGCCGGGTTTTTAACAGTAATGAGAAA
TGGCAGAAACAGCTGTACTACAGAGTAACCGATGGAAGAACATCGG
TCCAGCTAATGTGCCTGTCGTGCACGAGCCATTCTCCGGAACCTTACT
GTCTTTTCGACACGTCTCTTATAGCGAGGGAAAAAGATATCGCGCCA
GAGTTATACTTTACCTCTGATCCGCAAACGGCATACTGCACAATAAC
TCTGCCGTCCGGCGTTGTTCCGAGATTTCGAATGGAGCCTTAATAATGT
TTCACTGCCGGAATATTTGACGGCCACGACCGTTGTTTCGCATACCGC
TGGCCAAAGTACAGTGTGGAAGAGCAGCGCAGAGCAGGCGAGGCG
TGGATTTCTGGCCGGGAGGCAATATATACGAATGCACCGTCCTCAT
CTCAGACGGCACTCGCGTTACTACGCGAAAGGAGAGGTGCTTAACAA
ACACATGGATTGCGGTGGAAAACGGTGCTGCTCAGGCGCAGCTGTAT

| | |
|--|--|
| | TCACTCTTTTCTGGACTTGTGTCAGGATTATGCGGGAGCATATCTGCT TTGTACGCAACGCTATGGACCGCCATTTATTTT |
| <p style="text-align: center;">TMDgp64 contiene 6xhis (letras subrayadas)</p> | GAGCACTGCAACGCGCAAATGAAGACGGGTCCGTACAAGATTA AAA ACTTGGACATTACCCCGCCCAAGGAAACGCTGCAAAAGGATGTGGA AATTACCATTGTGGAGACGGACTACAACGAAAACGTGATTATCGGCT ACAAGGGGTACTACCAGGCGTATGCGTACAACGGCGGCTCATTGGAT CCCAACACACGCGTCGAAGAAACCATAAAAACTCTGAATGTGGGCA AGGAGGATTTACTCATGTGGAGCATCAGGCAGCAGTGCGAGGTGGG CGAAGAGCTGATCGATCGTTGGGGCAGTGACAGCGACGATTGTTTTC GCGACAACGAGGGCCGCGGCCAGTGGGTCAAAGGCAAAGAATTGGT GAAGCGGCAAATAACAATCACTTTGCGCACCACACGTGCAACAAAT CGTGGCGATGCGGCATTTCCACTTCGAAAATGTACAGCAGGCTCGAG TGCCAAGACGACACGGACGAGTGCCAAGTGTACATTTTGGACGCCGA AGGCAACCCCATCAACGTGACCGTGGACACTGTGCTTCATCGAGACG GCGTGAGTATGATTCTCAAACAAAAGTCTACGTTACCACACGCCAA ATAAAAGCTGCGTGTCTGCTCATTAAAGATGACAAAAATAACCCCGA TTCGATAACACGCGAACACTGTTTGATTGACAACGATATATATGATC TTTCGAAAAACACGTGGAATTGCAAGTTTAAACAGATGCATTAAACGC AAAGTTGAGCATCGAGTCAAGAAGCGGCCGCCACTTGGCGCCACA ACGTTAGGGCCAAATACACAGAGGGAGACACTGCCACCAAAGGCGA CCTGATGCATATCAAGAGGAGCTGATGTACGAAAACGATTTGCTGA AAATGAACATTGAGCTGATGCATGCGCACATCAACAAGCTAAACAAT ATGCTGCACGACCTGATAGTTTCCGTGGCCAAGGTGGACGAGCGTTT GATTGGCAATCTCATGAACAACCTCTGTTTCTTCGACATTTTTGTCGGA CGACACGTTTTTTGCTGATGCCTTGCACCAATCCGCCGGCACACACCA GTAATTGCTACAACAACAGCATTTACAAGGAAGGGCGTTGGGTGGCC AACACCGACTCGTCGCAATGCATAGATTTTAGCAACTACAAGGAACT AGCAATTGACGACGACGTTCGAGTTTGGATCCCGACCATCGGCAACA CGACCTATCACGACAGTTGGAAAGATGCCAGCGGCTGGTCGTTTATT GCTCAACAAAAAAGCAACCTCATAACCACCATGGAGAATACCAAGTT TGGCGGCGTCGGCACCAGTTTGGAGCGACATCACTTCCATGGCTGAAG GCGAATTAGCCGCTAAATTGACTTCGTTTCATGTTTGGTCATGTAGTTA |

| |
|---|
| ACTTTGTAATTATATTAATTGTAATTTTGTTTTTGTACTGTATGATTAG AAACCGTAATAGACAATATTTACATCACCATCACCATCAC |
|---|

Tabla A3. Secuencia del plásmido donador pACEMam1

| Plásmido | Secuencia nucleotídica |
|----------|---|
| pACEMam1 | ACCGGTTGACTTGGGTCAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT TTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAA GATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTC GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT GAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC CACCGTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACT CTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTC GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG GTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTA TCCCCTGATTGACTTGGGTGCTCTTCCCTGTGGATGCGCAGATGCCCT GCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAACTGAACAAAAT AGATCTAAACTATGACAATAAAGTCTTAACTAGACAGAATAGTTGT AAACTGAAATCAGTCCAGTTATGCTGTGAAAAAGCATACTGGACTTT TGTTATGGCTAAAGCAAACCTTTCATTTTTCTGAAGTGCAAATTGCCCG TCGTATTAAAGAGGGCGTGGCCAAGGGCATGTAAAGACTATATTCG CGGCGTTGTGACAATTTACCGAACAACCTCCGCGGCCGGGAAGCCGAT |

CTCGGCTTGAACGAATTGTTAGGTGGCGGTA CTTGGGTTCGATATCAA
AGTGCATCACTTCTTCCCGTATGCCCAACTTTGTATAGAGAGCCACTG
CGGGATCGTCACCGTAATCTGCTTGCACGTAGATCACATAAGCACCA
AGCGCGTTGGCCTCATGCTTGAGGAGATTGATGAGCGCGGTGGCAAT
GCCCTGCCTCCGGTGCTCGCCGAGACTGCGAGATCATAGATATAGA
TCTCACTACGCGGCTGCTCAAACCTTGGGCAGAACGTAAGCCGCGAGA
GCGCCAACAACCGCTTCTTGGTTCGAAGGCAGCAAGCGCGATGAATGT
CTTACTACGGAGCAAGTTCCCGAGGTAATCGGAGTCCGGCTGATGTT
GGGAGTAGGTGGCTACGTCTCCGAACTCACGACCGAAAAGATCAAGA
GCAGCCCGCATGGATTTGACTTGGTTCAGGGCCGAGCCTACATGTGCG
AATGATGCCCATACTTGAGCCACCTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCC
CTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATA
ACATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGGTGGATGCC
CGAGGCATAGACTGTACAAAAAACAGTCATAACAAGCCATGAAAA
CCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACC
AGTTGCGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGTTTACGAACCGAA
CAGGCTTATGTCAACTGGGTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTG
CGTCAACCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAAGTCGCCATAACTTCGTA
TAGCATAATTATACGAAGTTATCTGTA ACTATAACGGTCCTAAGGTA
GCGAGTTTAAACACTAGTATCGATCGCGATGTACGGGCCAGATATAC
GCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG
GTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTAC
GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGA
CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCC
ATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA
GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG
GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
TTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGA
GTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAG

| | |
|--|--|
| | <p>GTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTA CTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTG GCTAGTGGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAATTCAAAGGCCTACGTC GACGAGCTCACTTGTGCGCGCCGCTTTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCT CGACAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCA CATTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCC TGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTA TTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC ACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGATCACTGCTTGAGCCT AGAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT GCTGCCACCGCTGAGCAATAACTATCATAACCCCTAGGGTATACCCA TCTAATTGGAACCAGATAAGTGAATCTAGTTCCAAACTATTTTGTCA TTTTAATTTTCGTATTAGCTTACGACGCTACACCCAGTTCCCATCTAT TTTGTCACTCTTCCCTAAATAATCCTTAAAAACTCCATTTCACCCCTC CCAGTTCCCAACTATTTTGTCCGCCACA</p> |
|--|--|

Tabla A4. Características del plásmido donador pACEMam1 (Geneva Biotech, Suiza)

| Carácter | Características de pACEMam1 |
|-----------------|--|
| CMV | Promotor temprano de citomegalovirus |
| GmR | Gen de resistencia de gentamicina que permite identificar a la bacteria recombinante |
| Ori ColE1 | Origen de la replicación |
| Tn7 | Mini Tn7 elementos que permiten la transposición del plásmido en el bácmido que tienen el genoma de baculovirus. |
| Lox-P | Sitio específico de recombinación que contiene repeticiones invertidas imperfectas para la recombinación mediada por Cre recombinasa |

Tabla A5. Cuantificación de chIL12 (pg/mL) por ELISA en formato sandwich

| Horas pos-estimulación | Tipo de estimulación | chIL12 (pg/mL) |
|-------------------------------|---|-----------------------|
| 24 | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.05 | 478.43 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.1 | 757.00 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.2 | 735.57 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.05 | 384.14 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.1 | 351.29 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.2 | 381.29 |
| | CpG ODN (40µM) | 229.14 |
| | No estimulado | 0 |
| 48 | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.05 | 552.71 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.1 | 814.14 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.2 | 837.00 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.05 | 538.43 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.1 | 574.14 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.2 | 694.14 |
| | CpG ODN (40µM) | 697.00 |
| | No estimulado | 0 |
| 72 | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.05 | 478.43 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.1 | 585.57 |
| | “Ch-Bv-gpJ” MOI 0.2 | 629.86 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.05 | 428.43 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.1 | 529.86 |
| | Baculovirus no recombinante MOI 0.2 | 655.57 |
| | CpG ODN (40µM) | 404.14 |
| | No estimulado | 0 |

Tabla A6. Evaluación de signos clínicos, carga viral, título de anticuerpos y relación CD4/CD8.

| | | GRUPOS DE AVES | | | | | | |
|--|--------|---|------------------------------------|--|---|--|--|--------|
| | | A | B | C | D | E | F | p |
| | | 10 ⁵ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 10 ⁶ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 10 ⁷ UFP "Ch-Bv-gpJ" | 10 ⁶ UFP no recombinante | Control no inmunizado ni desafiado | Control de desafío | |
| SIGNOS CLÍNICOS POS-DESAFÍO Mediana (Rango) | 5 dpd | 0.5 (0-2) ^A | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 (0-1) | 0 (0-0) ^{A,B} | 0.5 (0-1) ^B | <0.02 |
| | 6 dpd | 1 (0-2) ^{A,B} | 0 (0-0) ^{A,C,D} | 0 (0-1) | 1 (0-1) ^{C,E} | 0 (0-0) ^{B,E,F} | 1 (0-2) ^{D,F} | <0.01 |
| | 8 dpd | 1 (0-3) ^{A,B,C,D} | 0 (0-1) ^{A,E} | 0 (0-1) ^{B,F} | 0 (0-0) ^{C,G} | 0 (0-1) ^{D,H} | 1 (0-3) ^{E,F,G,H} | <0.03 |
| | 9 dpd | 0.5 (0-2) ^{A,B,C} | 0 (0-1) ^{A,D} | 0 (0-0) ^{B,E} | 0 (0-1) ^F | 0 (0-1) ^G | 1.5 (1-2) ^{C,D,E,F,G} | <0.046 |
| | 10 dpd | 1 (0-2) ^A | 0 (0-1) ^{A,B,C} | 1 (0-1) ^B | 0 (0-2) ^D | 0 (0-1) ^E | 1.5 (0-3) ^{C,D,E} | <0.01 |
| | 12 dpd | 1.5 (0-2) ^{A,B,C,D} | 0 (0-1) ^{A,E} | 0 (0-0) ^{B,F} | 0 (0-1) ^{C,G} | 0 (0-1) ^{D,H} | 1 (0-2) ^{E,F,G,H} | <0.01 |
| | 13 dpd | 1 (0-2) ^A | 0 (0-1) ^B | 0 (0-1) ^{A,C} | 0 (0-1) ^D | 0 (0-1) ^E | 1 (0-2) ^{B,C,D,E} | <0.039 |
| CARGA VIRAL de los grupos de muestras (Log. copias virales pos-desafío) | 1 dpd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | N.A. |
| | 2 dpd | 4 | 0 | 0 | 3.4 | 0 | 0 | |
| | 3 dpd | 5.5 | 0 | 3.7 | 3.8 | 0 | 5.3 | |
| | 5 dpd | 5.2 | 0 | 4.3 | 4.7 | 0 | 5.4 | |
| | 6 dpd | 5.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.3 | |
| | 8 dpd | 5.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.8 | |
| | 9 dpd | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.8 | |
| 13 dpd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.5 | | |
| Título de anticuerpo: proporción; media geométrica de seropositivos (Rango) | 7dpi | 0/7; - | 0/7; - | 0/7; - | 0/7; - | 0/7; - | 0/7; - | <0.05 |
| | 14dpi | 0/7; - | 1/7; 358 [†] | 1/7; 569,8 [†] | 1/7; 651,6 [†] | 0/7; - | 0/7; - | |
| | 7dpd | 6/7 ^{A,B} ; 3916,56 (2120-6187) ^A | 0/7 ^{A,C} ; - | 2/7 ^D ; 525,6 (482-573) ^A | 2/7 ^E ; 1070,52 (722- 1587) | 0/7 ^{B,F} ; - | 7/7 ^{C,D,E,F} ; 2141,56 (625- 4190) | |
| | 14dpd | 3/7; 5963,28 (4762-6283) | 1/7; 978,16 [†] | 1/7; 532,75 [†] | 2/7; 1179,56 (555- 2509) | 0/7 ^A ; - | 5/7; 2595 (382- 5907) | |
| | 7dpi | 3.798 (±1.44) | 4.228 (±0.88) | 3.4146 (±0.66) | 3.5928 (±1.32) | 2.9107 (1.39) | 3.0345 (±1.15) | NS |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|----|
| RELACIÓN | 14dpi | 3.842 (± 1.42) | 3.953 (± 1.57) | 3.8767 (± 0.88) | 3.6803 (± 1.14) | 3.7846 (1.15) | 3.497 (± 0.898) | NS |
| CD4/CD8 | 7dpd | 4.802 (± 1.72) | 4.3843 (± 1.58) | 4.0689 (± 1.09) | 3.6073 (± 0.87) | 3.8498 (1.66) | 3.8403 (± 0.95) | NS |
| (Media\pmD.S) | 14dpd | 7.179 (± 2.66) | 7.722 (± 2.59) | 8.557 (± 4.65) | 7.089 (± 2.23) | 7.567 (2.95) | 5.661 (± 0.97) | NS |

dpi: días pos-inmunización; dpd: días pos-desafío. Para mayor detalle ver Tabla 3; 4; 5 y 6. N.A: No aplica