

Tesis Doctoral

Desarrollo y evaluación de un candidato vacunal para IBD producido en plantas: una alternativa a las vacunas tradicionales

Lucero, María Soledad

2018

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

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

Cita tipo APA:

Lucero, María Soledad. (2018). Desarrollo y evaluación de un candidato vacunal para IBD producido en plantas: una alternativa a las vacunas tradicionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6390_Lucero

Cita tipo Chicago:

Lucero, María Soledad. "Desarrollo y evaluación de un candidato vacunal para IBD producido en plantas: una alternativa a las vacunas tradicionales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6390_Lucero



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Desarrollo y evaluación de un candidato vacunal para IBD producido en plantas: una alternativa a las vacunas tradicionales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área QUÍMICA BIOLÓGICA

Lic. María Soledad Lucero

Director: Dra. Analía Berinstein

Director asistente: Dra. Evangelina Gómez

Consejero de estudios: Dr. Luis Scolaro

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar

Buenos Aires, 27 de Febrero 2018

RESUMEN

Desarrollo y evaluación de un candidato vacunal para IBD producido en plantas: una alternativa a las vacunas tradicionales

El Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) es el agente etiológico responsable de una enfermedad aguda contagiosa e inmunosupresora que afecta pollos jóvenes y causa importantes pérdidas económicas. La vacunación con virus inactivados o vivo-atenuados constituye el principal método de prevención y control de IBDV. Sin embargo, estas vacunas presentan desventajas debido a su naturaleza viral. En consecuencia, existe la necesidad de reemplazar dichas vacunas por nuevas herramientas sanitarias que tengan alta eficiencia con menores efectos colaterales. VP2, la proteína de cápside del virus, es el principal inductor de inmunidad protectora por lo que es el candidato apropiado para el desarrollo de vacunas a subunidad.

En el presente trabajo se desarrolló una vacuna recombinante para IBDV basada en la expresión transitoria de VP2 en *Nicotiana benthamiana*. Se caracterizó el antígeno y se evaluó la inmunogenicidad y capacidad protectora del mismo tras la inoculación por distintas vías tanto en pollos libres de patógenos específicos como en aves de producción.

Los resultados demostraron que el inmunógeno recombinante fue efectivo en generar una respuesta inmune protectora por vía parenteral pero no por vía de mucosas a menos que la inoculación oral haya seguido a una primera inoculación intramuscular. A su vez, el inmunógeno logró incrementar los niveles de anticuerpos específicos en gallinas reproductoras que fueron transmitidos a la progenie.

Estos resultados evidencian un potencial uso del inmunógeno producido en planta como una alternativa a las vacunas convencionales para la enfermedad infecciosa de la bursa.

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Gumboro, IBDV, VP2, vacuna recombinante, sistema de expresión en planta, respuesta inmune aviar.

ABSTRACT

Development and evaluation of a vaccine candidate for IBD produced in plants: an alternative to traditional vaccines

Infectious bursal disease virus (IBDV) is the etiological agent of an immunosuppressive and highly contagious disease that affects young birds causing important economic losses in the poultry industry. Currently, vaccination with inactivated and live-attenuated vaccines induces immunity in the flock against virulent viruses. However, conventional vaccines have a number of disadvantages because of their viral nature. Thus, there is a need to replace them by new ones with higher efficacy and fewer side-effects. The capsid protein VP2, which contains the major neutralizing epitopes, has been used for the development of subunit vaccines.

In the present work a recombinant vaccine for IBDV based on the transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* was developed. The antigen was characterized and its immunogenicity and protective capacity after inoculation through different routes was evaluated in specific pathogen free chickens and in breeder hens.

The results obtained showed that the recombinant immunogen was effective in generating an immune protective response through the parenteral but not mucosal routes unless oral inoculation followed an intramuscular prime. Moreover, the immunogen increased specific antibody levels in breeder hens which were transmitted to the offspring.

These results evidence a potential use of the plant-based vaccine as an alternative to conventional vaccines against the infectious bursal disease.

KEY WORDS: Gumboro disease, IBDV, VP2, recombinant vaccine, plant expression system, avian immune response.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a las siguientes personas que colaboraron en los resultados de esta tesis:

a nuestro bioterista Silvio Diaz, por su trabajo en el mantenimiento y cuidado de los animales;

a los chicos del invernáculo Matias Rodriguez, Agustin Montenegro y Juan Ignacio Tevez, por el mantenimiento y cuidado de las plantas;

a Silvina Pinto y Fernando Delgado por las histologías de las bursas;

a Zulma Canet y la gente de la EEA Pergamino que colaboraron en el experimento de evaluación del inmunógeno en aves de producción;

y, especialmente, a mis directoras y a miscompañeros de grupo Ana, Eva, Silvi, Majo, Mati y Juan que siempre estuvieron dispuestos a asistir en cada paso del trabajo, desde el diseño y realización de los experimentos hasta el análisis de resultados, enriqueciendo la discusión de los mismos.

También quiero agradecer

a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por la educación brindada;

al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) y al INTA por las becas y los subsidios otorgados que permitieron llevar a cabo esta tesis;

y en particular al IB, CICVyA, INTA por brindarme un lugar de trabajo.

Por último, agradezco a todas las personas que en estos años me acompañaron a transitar el doctorado y me ayudaron a crecer y desarrollarme como persona.

Publicaciones derivadas del presente trabajo:

Lucero MS, Gómez E, Richetta M, Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Delgado F, Berinstein A. Effect of Different Routes of Inoculation on Plant-Derived VP2 Immunogenicity and Ability to Confer Protection Against Infectious Bursal Disease. *J Virol Antivir Res* 2016, 5:4

Otras publicaciones realizadas durante el período de mi beca doctoral:

Lucero MS, Gómez E, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Chimeno Zoth S and Berinstein A. Recombinant vaccines and Infectious Bursal Disease Virus. *CAB Reviews* 2012 7, No 070

Gómez E, **Lucero MS**, Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Berinstein A. Transient expresión of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against Infectious Bursal Disease. *Vaccine*. 2013, May;31(23):2623-7

Carballeda JM, Chimeno Zoth S, Gómez E, **Lucero MS**, Gravisaco MJ, Berinstein A. Immune response elicited by the oral administration of an intermediate strain of IBDV in chickens. *Brazilian Journal of Microbiology* 2015 Mar 4;45(4):1521-5.

Carballeda JM, Maroniche G, **Lucero MS**, Gómez E, Chimeno Zoth S and Berinstein A. Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. *Virology* 2015 Sep;483:312-7.

Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Richetta M, Gómez E, **Lucero MS**, Berinstein A. Immunomodulatory effect of baculovirus in chickens: how it modulates the immune response against IBDV. *Antiviral Research* 2016 Jul;131:35-9.

Richetta M, Gómez E, **Lucero MS**, Chimeno Zoth S, Gravisaco MJ, Calamante G, Berinstein A. Comparison of homologous and heterologous prime-boost immunizations combining MVA-vectored and plant-derived VP2 as a strategy against IBDV. *Vaccine* 2017 Jan 3;35(1):142-148

Chimeno Zoth S, Carballeda JM, Gravisaco MJ, Gómez E, **Lucero MS**, Richetta M, Berinstein A. IBDV challenge with an intermediate IBDV strain for evaluation of immunogens in chickens: Seeking for better animal welfare conditions. *SF J Virol* 2017,1:1

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 LA INDUSTRIA AVICOLA	10
1.2 SISTEMA INMUNE AVIAR	12
1.2.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA INMUNE	12
1.2.2 INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA	14
1.3 LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA.....	16
1.3.1 MECANISMO DE INFECCIÓN DE IBDV E INMUNOSUPRESIÓN	18
1.3.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
1.3.3 PREVENCIÓN.....	25
1.4 LAS PLANTAS COMO SISTEMAS DE EXPRESIÓN.....	30
1.4.1 EXPRESIÓN ESTABLE VS EXPRESIÓN TRANSITORIA	31
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.1.1 VIRUS	36
3.1.2 CEPAS BACTERIANAS	36
3.1.3 PLANTAS	36
3.1.4 CULTIVOS CELULARES	36
3.1.5 ANIMALES.....	37
3.2 AMPLIFICACIONES Y TITULACIONES VIRALES.....	37
3.2.1 LZD.....	37
3.2.2 WINTERFIELD.....	37
3.3 CLONADO DE VP2 EN pEAQ.....	38
3.3.2 PCR	39
3.3.3 CLONADO EN pGEMT-easy	39
3.3.4 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	40
3.3.5 CLONADO EN pEAQ	40
3.4 OBTENCIÓN DE LA AGROBACTERIA RECOMBINANTE	41
3.5 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE <i>N. BENTHAMIANA</i> POR AGROINFILTRACIÓN	41
3.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	42

3.7 SEMIPURIFICACIÓN DE PARTICULAS SUBVIRALES	42
3.8 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	43
3.9 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	43
3.9.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	43
3.9.2 ELECTROTRANSFERENCIA	44
3.9.3 DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS	44
3.9.4 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE	44
3.9.5 CUANTIFICACIÓN DE VP2	45
3.10 EXPERIMENTOS EN ANIMALES	45
3.10.1 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE VP2 PRODUCIDA EN PLANTAS POR DISTINTAS VÍAS.....	45
3.10.2 EVALUACIÓN DE UNA DOSIS MAYOR DEL INMUNOGENO POR VÍA ORAL.....	46
3.10.3 EVALUACIÓN DEL INMUNÓGENO COMO ALTERNATIVA A LA VACUNA INACTIVADA .	47
3.11 PANEL DE PRUEBAS PARA EXPERIMENTOS CON ANIMALES.....	48
3.11.1 ELISA.....	48
3.11.2 SERONEUTRALIZACIÓN POR DILUCIÓN LÍMITE.....	48
3.11.3 ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	49
3.11.5 HISTOPATOLOGÍA	49
3.11.6 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1 RESULTADOS PREVIOS AL INICIO DE LA TESIS	51
4.2 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE VP2 PRODUCIDA EN PLANTAS POR DISTINTAS VÍAS.....	53
4.2.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL	55
4.2.2 EVALUACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN BURSA.....	57
4.2.3 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DE LA BURSA.....	58
4.2.4 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA	60
4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VP2 EN PLANTAS	62
4.4 OBSERVACIÓN DE PARTÍCULAS SUBVIRALES.....	64
4.5 EFECTO DEL AUMENTO DE LA DOSIS DEL INMUNÓGENO RECOMBINANTE POR VÍA ORAL... 67	
4.5.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL	69
4.5.2 EVALUACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN BURSA.....	71
4.5.3 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DE LA BURSA.....	71
4.5.4 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA	73
4.6 NUEVO INMUNÓGENO COMO ALTERNATIVA A LA VACUNA INACTIVADA.....	75
4.6.1 RESPUESTA HUMORAL EN GALLINAS	76

4.6.2 RESPUESTA HUMORAL EN LA PROGENIE.....	77
5. DISCUSIÓN.....	81
5.1 <i>N. BENTHAMIANA</i> COMO PLATAFORMA DE EXPRESIÓN PARA VP2	81
5.2 DESEMPEÑO DEL INMUNÓGENO RECOMBINANTE EN EL HOSPEDADOR NATURAL.....	85
5.3 NUEVO CANDIDATO VACUNAL PARA GALLINAS DE PRODUCCIÓN.....	90
5.4 FACTIBILIDAD DE LAS VACUNAS BASADAS EN PLANTAS EN EL MERCADO	92
6. CONCLUSIONES	96
7. BIBLIOGRAFÍA	98

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La sanidad y la bioseguridad constituyen, junto con el desarrollo de la genética, los pilares sobre los cuales se basa el incremento de la capacidad competitiva del sector avícola. Las grandes pérdidas en la productividad debidas a enfermedades infecciosas en aves es un problema sumamente importante y, por lo tanto, para propiciar un continuo y robusto desarrollo de la industria avícola, se requiere un control efectivo en el aspecto sanitario. Uno de los patógenos que afecta la producción avícola es el Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (*Infectious Bursal Disease Virus*, IBDV). El IBDV es el agente causante de una enfermedad aguda y altamente contagiosa, enfermedad de Gumboro, que afecta especialmente a animales jóvenes, provocando generalmente inmunosupresión y la consecuente vulnerabilidad a otros agentes infecciosos. En este contexto, el desarrollo local de vacunas alternativas más eficaces y seguras es sumamente importante.

1.1 LA INDUSTRIA AVICOLA

Durante la última década el sector avícola manifestó una importante evolución en todos sus indicadores productivos a nivel mundial. La carne de pollo presentó el mayor aumento de demanda en el mercado global de carnes, estimándose un incremento del 37 % en su producción, y hoy en día es una de las carnes más consumidas junto con la porcina. Se espera que el consumo de carne aviar siga creciendo en los próximos 10 años, especialmente en los países en vías de desarrollo, debido a que la carne aviar representa menores costos para los productores y, por ende, para los consumidores, con respecto a otras carnes (Figura 1).

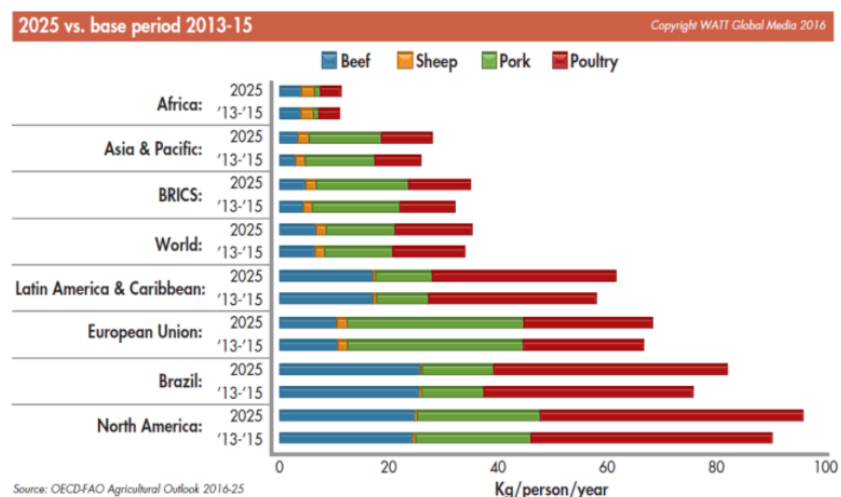


Figura 1: Consumo mundial per cápita de los distintos tipos de carne. La carne aviar representa uno de los tipos de carnes más consumidos en la actualidad, especialmente en países americanos, y se proyecta un incremento en su consumo hacia el 2025. (<http://www.poultrytrends.com/2016>).

En la Argentina la avicultura es una actividad de primer nivel dentro del concierto agropecuario y juega un rol importante en el producto bruto pecuario del país. En los últimos 10 años este sector ha crecido geométricamente tanto en producción como en consumo interno y externo (Tabla 1), con exportaciones a más de 30 países (<http://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/aves/estadistica/>). La Argentina hoy ocupa el 8º lugar mundial como productor y 6º como exportador (<http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/aves>).

		2006	2016
carne aviar	producción	1.159 mil tn	1.936 mil tn
	exportación	144 mil tn	195 mil tn
	consumo interno	27,8 kg/cap/año	42,5 kg/cap/año
huevo en cáscara	producción	7.450 millones de huevos	11.770 millones de huevos
	consumo interno	183 huevo/persona/año	265 huevo/persona/año
huevo industrializado	producción	738 mil tn	1.092 mil tn
	exportación	2129 tn	2170 tn

Tabla 1: Comparación de indicadores productivos del sector avícola argentino en 2006 vs 2016. Se observa un importante incremento en la producción, exportación y consumo interno de carne aviar y huevos durante la última década.

El incremento en la productividad del sector avícola ha sido fundamentalmente dirigido por la intensificación de los sistemas productivos, es decir, la producción de la mayor cantidad de kilogramos de producto en la menor superficie posible. La alta concentración de animales bajo un mismo techo genera un escenario altamente favorable para la diseminación de enfermedades infecciosas que ocasionan importantes pérdidas en la productividad con consecuencias económicas. Entre las enfermedades que afectan a las aves de corral en nuestro país podemos nombrar a aquellas causadas por bacterias como la clamidiosis, micoplasmosis y salmonelosis, y aquellas causadas por virus como la laringotraqueitis, bronquitis infecciosa y Gumboro o enfermedad infecciosa de la bursa (<http://www.oie.int>).

Los principios básicos para la prevención y el control de las enfermedades infecciosas se basan en medidas de higiene y bioseguridad y en programas adecuados de vacunación que garanticen la sanidad animal. Estos componen, junto con el mejoramiento genético, los fundamentos para un continuo y robusto progreso de la industria avícola.

1.2 SISTEMA INMUNE AVIAR

El hecho de que un ave desarrolle o no una enfermedad dependerá de su condición fisiológica, su nivel de inmunidad, la cantidad de patógenos invasores y la virulencia de los mismos. Si bien el sistema inmune de las aves comparte algunas similitudes con los de otras especies, existen a su vez, muchas diferencias respecto a los genes, moléculas, células y órganos que lo componen (Kaiser 2010). Por lo tanto, es importante destacar algunas de las características particulares del sistema inmune aviar para poder comprender los mecanismos involucrados en la defensa contra agentes infecciosos.

1.2.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA INMUNE

La estructura y distribución del tejido linfoide en aves es distinta a la de los mamíferos. Todas las especies aviares presentan dos órganos primarios donde tiene lugar la maduración linfocitaria independiente de antígenos: el timo, que al igual que en mamíferos, es el sitio principal de diferenciación y maduración de linfocitos T y, por lo tanto, es necesario

para el desarrollo de la respuesta inmune celular; y la bursa de Fabricio (BF), un órgano exclusivo de las aves, localizado dorsalmente a la cloaca, donde se desarrollan y diferencian los linfocitos B productores de anticuerpos (Figura 1). Una vez maduras, las células B y T inmunocompetentes migran a los órganos linfoides secundarios (OLS) que proporcionan el entorno adecuado para que éstas interactúen entre sí, con los antígenos foráneos y con las células presentadoras de antígeno, para generar una respuesta inmune apropiada y diseminarla al resto del cuerpo. Los OLS son el bazo, los centros germinales en tejido conectivo y los tejidos linfoides asociados a mucosas, dentro de los cuales encontramos el asociado a la cabeza (glándula de Harder y conjuntiva ocular), la nariz, los bronquios, los genitales, la piel y, el más extenso, el asociado al sistema digestivo (tonsilas cecales, placas de Peyer y divertículo de Meckel) (Oláh et al. 2014) (Figura 2)

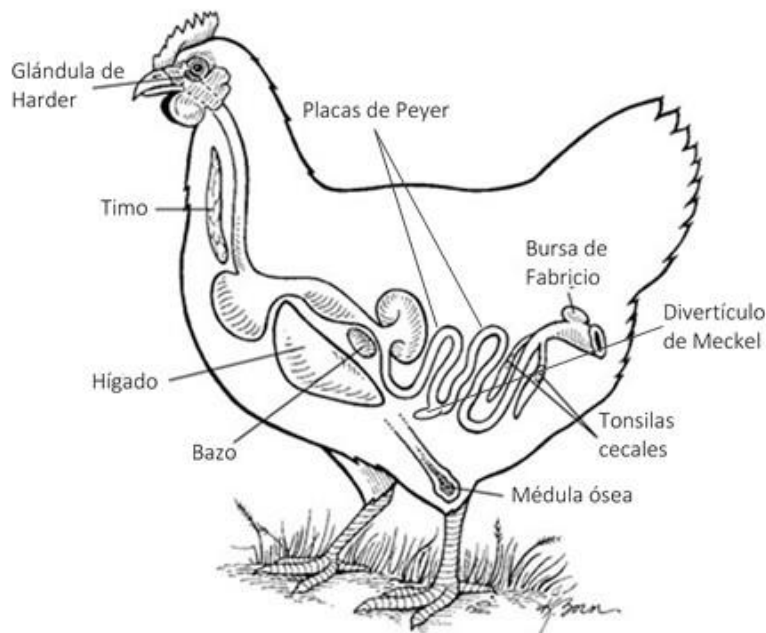


Figura 2: Anatomía del sistema inmune aviar. La bursa de Fabricio y el timo son los órganos linfoides primarios donde maduran los linfocitos B y T respectivamente. El bazo y los órganos y tejidos linfoides asociados a mucosas como la glándula de Harder, tonsilas cecales, divertículo de Meckel y placas de Peyer, entre otros, forman parte de los órganos linfoides secundarios. Adaptado de <http://www.dummies.com/home-garden/hobby-farming/raising-chickens/the-organs-of-a-chickens-immune-system/>

1.2.2 INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

Al igual que los mamíferos, el sistema inmune de las aves comprende dos tipos de inmunidad: innata y adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa para impedir y combatir infecciones. Ésta comprende barreras físicas y químicas como el plumaje, la piel, el epitelio de los sistemas respiratorio y digestivo, y las secreciones gástricas, así como proteínas de la sangre y células fagocitarias. Si bien durante muchos años se la consideró como una barrera inespecífica, hoy se sabe que la inmunidad innata presenta cierta especificidad, no contra patógenos individuales, sino contra clases de patógenos. Además, es la responsable de modular el rumbo en el que se desarrollará la respuesta inmune adaptativa (Juul-Madsen et al. 2014).

La inmunidad adaptativa se inicia cuando la inmunidad innata no logra contener al agente infeccioso y se basa en el reconocimiento de características moleculares específicas del patógeno, dando como resultado una serie de respuestas que en general logran eliminarlo y establecen la protección contra desafíos subsiguientes. Esta memoria inmunológica es producto de la exposición directa a los patógenos (o a moléculas derivadas de los mismos), ya sea por infección natural o por vacunación.

Tal como sucede en otros animales, la inmunidad adaptativa de las aves puede subdividirse en inmunidad humoral e inmunidad mediada por células (Kaiser 2010). Los anticuerpos o inmunoglobulinas son la unidad funcional de la inmunidad humoral y son producidos por los linfocitos B. En aves se describieron tres isotipos de anticuerpos: IgM, IgY (análogo a la IgG de mamíferos) e IgA. Las IgM aparecen predominantemente luego de la primera exposición al antígeno, tienen su máximo de expresión entre los 4 y 8 días y luego empiezan a declinar rápidamente. En una segunda instancia comienza la producción de las inmunoglobulinas predominantes en suero, las IgY, consideradas los anticuerpos protectores más importantes (Figura 3). Las IgA se encuentran principalmente en el sistema de mucosas de los ojos, intestino y tracto respiratorio proporcionando protección local en estos tejidos (Tizard 2002)

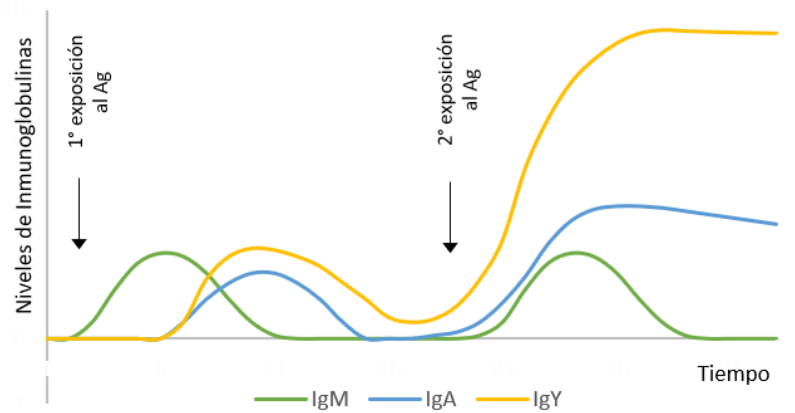


Figura 3: Nivel de inmunoglobulinas en sangre luego de la exposición a un antígeno (Ag). Cuando el antígeno penetra por primera vez en el organismo, genera una respuesta inmune primaria caracterizada principalmente por anticuerpos IgM que son los primeros en aparecer y declinan rápidamente. En una segunda instancia comienza la producción de las inmunoglobulinas IgY. Si el antígeno vuelve a penetrar una segunda vez, se produce la respuesta inmune secundaria, más rápida, intensa y prolongada donde predomina la respuesta IgY de alta afinidad. Las IgA se encuentran principalmente en el sistema de mucosas pero pueden detectarse en sangre días después de la exposición al antígeno.

Por otro lado, los linfocitos T son los responsables de la respuesta celular, ya sea la citotóxica que juega un papel importante en la eliminación de patógenos intracelulares como los virus (T CD8+), o de ayuda (T CD4+). Dentro de estos últimos, el paradigma Th1/Th2 se mantiene al igual que en mamíferos (Degen et al. 2005, Pendl y Tizard 2016). Según el tipo de antígeno con que son estimuladas, estas células activarán la expresión de una serie de citoquinas que direccionarán la respuesta inmune en el sentido más apropiado para combatir al patógeno al que se enfrenten (Figura 4). Si bien en los últimos años se ha identificado la existencia de linfocitos de ayuda Th17 en aves, esta respuesta está aún poco caracterizada (Welch 2015).

Dado que el sistema inmune de los pollos recién nacidos no está completamente maduro, la forma de protección frente a patógenos durante los primeros días de vida se basa principalmente en los anticuerpos específicos que fueron transmitidos por vía materna (Härtle et al. 2014). Sin embargo, esta inmunidad pasiva es efectiva durante un breve periodo hasta que decaen los anticuerpos maternos. Resulta entonces necesario un programa efectivo de vacunación para generar memoria inmunológica que proteja a las aves frente a posibles infecciones durante todo su ciclo productivo.

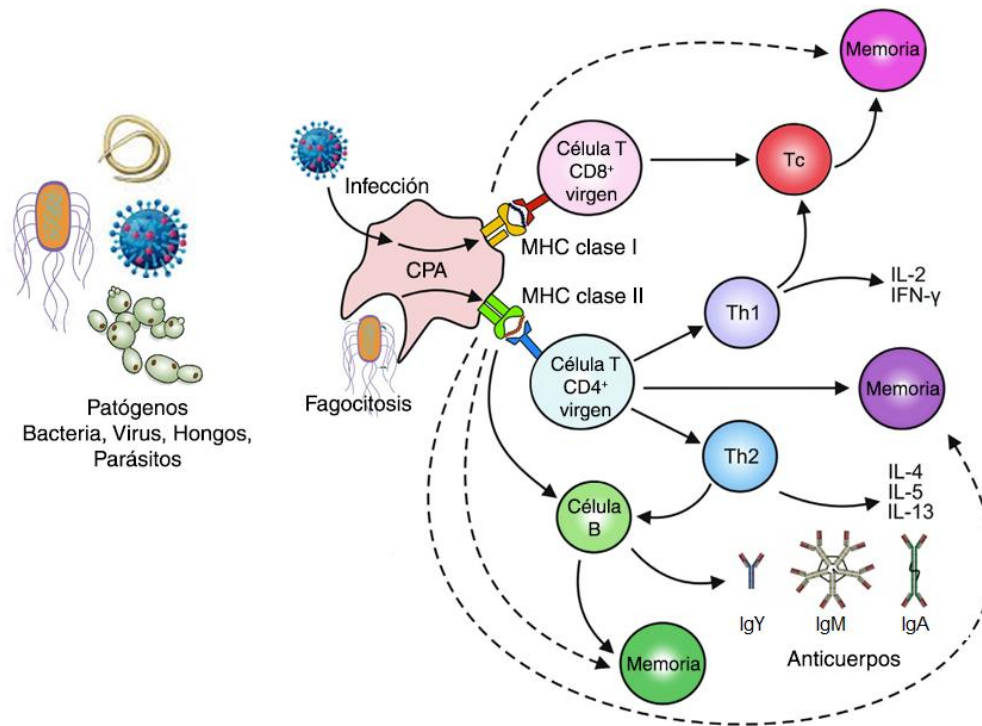


Figura 4: Inducción de la respuesta inmune frente a patógenos. La infección con un patógeno intracelular generará principalmente una respuesta celular citotóxica y de ayuda de tipo Th1. Por el contrario, los patógenos extracelulares generan esencialmente una respuesta celular de tipo Th2 y una respuesta humoral caracterizada por la producción de anticuerpos (IgM, IgY o IgA) por parte de linfocitos B. Una reinfección con el mismo patógeno producirá una activación de las células de memoria llevando a una respuesta inmune más rápida (flechas punteadas). CPA: células presentadoras de antígeno. Tc: linfocito T citotóxico. Th: linfocito T helper. Adaptado de Van de Sandt et al. 2012

1.3 LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BURSA

Como se mencionó anteriormente, entre las enfermedades infecciosas que afectan a la producción avícola se encuentra la enfermedad infecciosa de la bursa (IBD, por sus siglas en inglés), también conocida como enfermedad de Gumboro. Esta es una enfermedad de distribución mundial (Figura 5) altamente contagiosa e inmunosupresora que afecta pollos jóvenes, principalmente de entre 3 y 6 semanas de edad, aunque los animales fuera de ese rango etario también pueden enfermarse (Müller et al. 2003, Mahgoub 2012). Esta afección causa importantes pérdidas económicas ya sea de forma directa a través de síntomas clínicos y mortalidad, o indirectamente, debido a la susceptibilidad incrementada a otras enfermedades y la interferencia negativa con la vacunación efectiva como consecuencia de la inmunosupresión (Rosenberger y Gelb 1978, Goryo et al. 1984).

El agente etiológico de IBD es el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV) perteneciente a la familia *Birnaviridae*, género *Avibirnavirus*. Se han descrito dos serotipos de IBDV, I y II, que son capaces de infectar pollos; sin embargo, sólo el primero es patogénico en esta especie (Jackwood et al. 1985, Ismail et al. 1988). Dentro de los virus de serotipo I, las cepas se clasifican tradicionalmente según su patotipo en clásicas (cIBDV), variantes (vaIBDV) y muy virulentas (vvIBDV) (Mahgoub 2012). La virulencia de la cepa viral, junto con la edad y raza de las aves, y los niveles de anticuerpos maternos constituyen los principales factores que van a determinar el desenlace de la infección por IBDV.

En el campo se distinguen principalmente 3 formas de la enfermedad: clásica, inmunosupresiva y aguda. La forma clásica está asociada a la presencia de cIBDV y usualmente aparece después de la caída de los títulos de anticuerpos maternos en las parvadas vacunadas. Suele ser subclínica y tener una baja mortalidad específica (0-5 %). Los signos clínicos, cuando son visibles, incluyen picadura de cloaca, temblores, plumas erizadas, diarrea acuosa, anorexia, depresión, postración y muerte. Dado que en la mayoría de los casos no hay signos de la infección por IBDV, el diagnóstico suele obtenerse durante la necropsia (Van den Berg et al. 2000, Eterradosi y Saif 2008, Chanie y Kegne 2014). La forma inmunosupresiva está relacionada a la emergencia de cepas vaIBDV que son capaces de evadir los anticuerpos neutralizantes de aves vacunadas ya que son serológicamente diferentes a las cepas vacunales utilizadas (Jackwood y Saif 1987, Snyder et al. 1992). Si bien esta forma de la enfermedad es asintomática en la mayoría de los casos, la inmunocompetencia de los animales se ve severamente comprometida (Van Den Berg et al. 2000, Chanie y Kegne 2014). Es por ello que las infecciones con estas cepas suelen causar considerables pérdidas económicas debido a la disminución en la efectividad de los programas de vacunación y a la susceptibilidad incrementada a patógenos oportunistas (Winterfield et al. 1978, Zachar et al. 2016). Finalmente, la forma aguda es causada por cepas vvIBDV que son capaces de infectar en presencia de anticuerpos maternos y causan una mortalidad mayor a la esperada (Van den Berg 2000). Los signos clínicos suelen ser los mismos que los causados por la forma clásica, aunque sus manifestaciones son más severas

y más generalizadas en la parvada afectada. Las tasas de mortalidad varían entre el 50 y el 100 % (Van den Berg 2000, Eterradossi y Saif 2008).

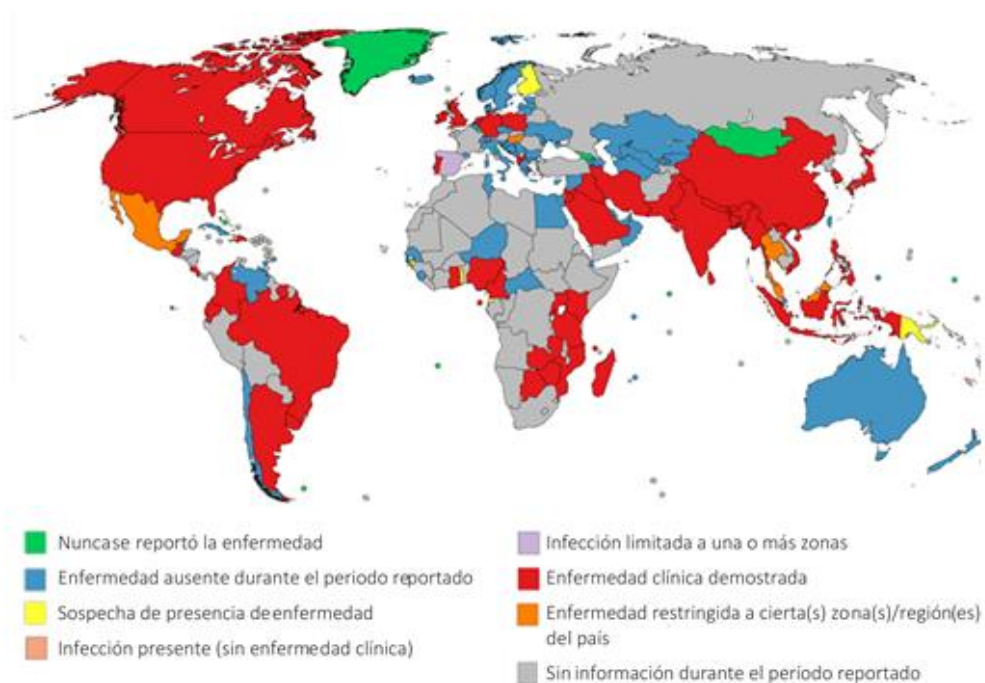


Figura 5: Distribución mundial de la enfermedad de Gumboro para el período julio-diciembre del año 2016. (Fuente: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist).

1.3.1 MECANISMO DE INFECCIÓN DE IBDV E INMUNOSUPRESIÓN

La transmisión horizontal de IBDV ocurre a través de la ingesta de agua y comida contaminada con heces infectivas (Smith et al. 2015). IBDV inicia la replicación en linfocitos y macrófagos del tejido linfoide asociado a intestino. Esta etapa de la replicación viral marca la viremia primaria. Desde allí el virus es transportado por las células fagocíticas a otros tejidos, alcanzando el hígado a las 5 horas post infección y luego accede la bursa de Fabricio donde ocurre la replicación viral más pronunciada (Sharma et al. 2000). El virus se disemina rápidamente a través de los folículos bursales, las unidades funcionales de la bursa, que alojan células epiteliales, linfocitos, macrófagos, y células de plasma (Figura 6). A las 13 horas post infección, IBDV puede ser detectado en la mayoría de los folículos y su replicación

ocasiona una extensa destrucción de las células linfoides de las regiones medulares y corticales de los mismos (Sharma et al. 2000, Müller et al. 2010).

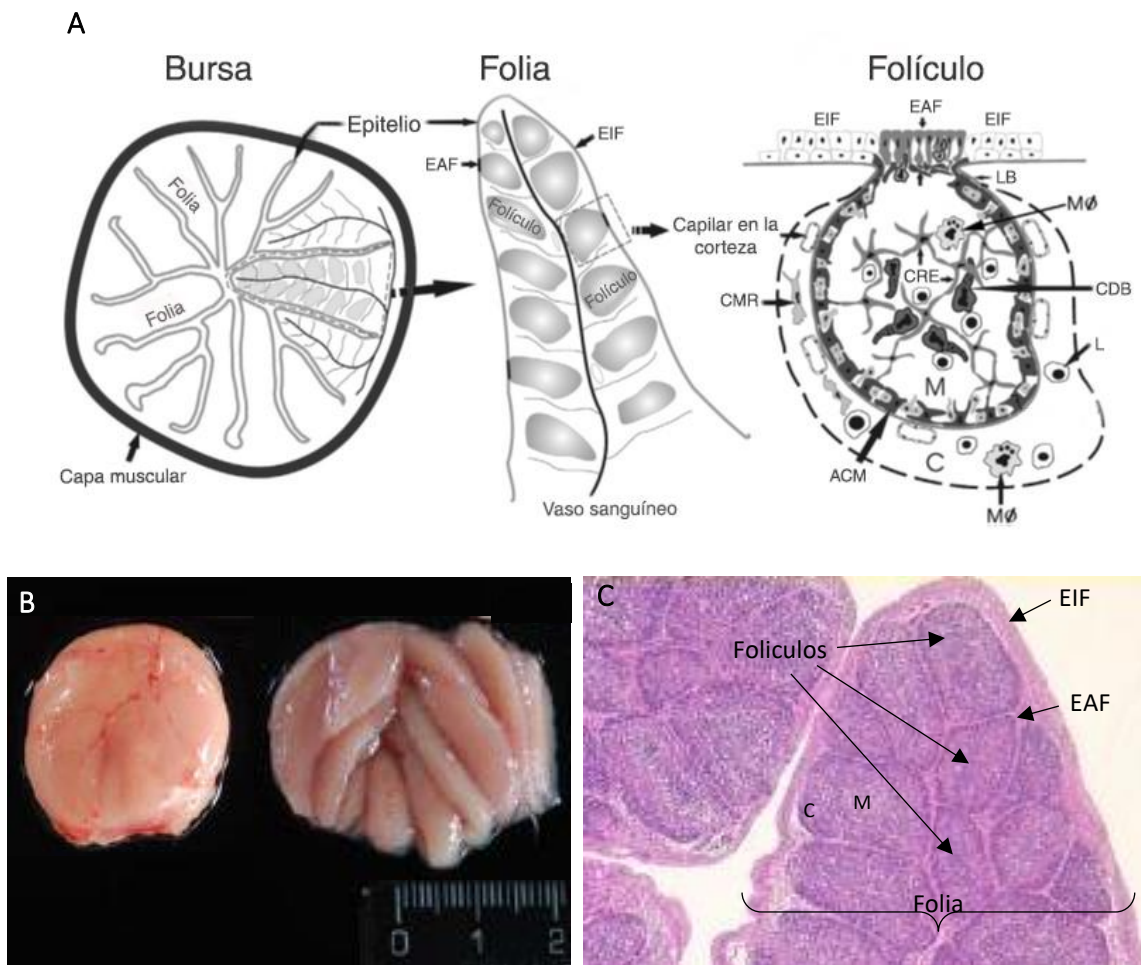


Figura 6: Estructura de la bursa de Fabricio. A. Representación esquemática de la organización histológica de los folículos bursales mostrando las células que forman el arco corticomedular (ACM) (sombreadas); el epitelio asociado al folículo (EAF); el epitelio interfolicular (EIF); las células reticulares epiteliales (CRE); las células dendríticas de la bursa (CDB); lámina basal (LB); linfocitos (L); macrófagos (MØ); médula (M), corteza (C); células mesenquimales reticulares (CMR) (Oláh et al. 2014). B. Vista externa e interna de la Bursa de Fabricio. C. Corte histológica de una bursa teñido con eosina/hematoxilina donde se observa una folia y algunas de las estructuras previamente descritas.

La llegada del virus a la bursa viene acompañada con una significativa infiltración de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en este órgano. Existen evidencias que sugieren que las células T pueden modular la inmunopatogénesis al restringir la replicación de IBDV en la bursa en una etapa temprana de la enfermedad (Rautenschlein et al. 2002). Si bien a través de la liberación de citoquinas y efectos citotóxicos, las células T pueden promover el

clearance del virus, al mismo tiempo intensifican la destrucción del tejido bursal y retardan la recuperación de los folículos bursales (Sharma et al. 2000).

El blanco principal del virus son las células B en división que portan inmunoglobulina M (IgM) en su membrana y que se encuentran presentes principalmente en la bursa de Fabricio, aunque también hay evidencia de replicación viral y destrucción celular en OLS como las tonsilas cecales y el bazo. Esto trae como consecuencia una supresión prolongada de la respuesta de anticuerpos primaria (Rodenberg et al. 1994, Sharma et al. 2000). Por otro lado, aunque las células T no son susceptibles a la infección por IBDV, se ha observado que la respuesta inmune celular también se ve comprometida ya que los linfocitos T de pollos infectados tienen una capacidad disminuida de secretar IL-2 y proliferar *in vitro* frente a la estimulación con mitógenos. A su vez, hay evidencia de que IBDV puede alterar funciones de los macrófagos, entre ellas su capacidad fagocítica, lo cual puede afectar la respuesta inmune. Todos estos factores contribuyen a la inmunosupresión observada en los animales (Sharma et al. 2000).

En aquellos animales que sobreviven a la fase aguda de la enfermedad, la replicación del virus disminuye, los folículos bursales se repueblan con linfocitos B IgM+, y la respuesta primaria de anticuerpos es gradualmente restaurada a niveles normales.

1.3.2 AGENTE ETIOLÓGICO

El IBDV es un virus no envuelto de simetría icosaédrica cuyo genoma consiste de dos segmentos de ARN doble cadena lineales denominados A y B (Dobos et al. 1979, Müller et al. 1979) (Figura 7A). Mientras que el segmento B, más corto (2,8 kpb), codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente, (*RdRp*) de 97 kDa, denominada VP1 (Macreadie y Azad 1993, von Einem et al. 2004), el segmento A de 3,2 kpb contiene dos marcos de lectura abiertos solapados que codifican para el resto de las proteínas virales (Spies et al. 1989). El primer marco de lectura abierto, y el más pequeño, codifica para la proteína viral no estructural VP5 (17 kDa), mientras que el segundo codifica para una poliproteína que luego es autoclivada en la proteasa VP4 (28 kDa) (Da Costa et al. 2000), y las proteínas estructurales pVP2 (512 aa, 54,4 kDa) y VP3 (32 kDa) (Kibenge et al. 1988). Luego, VP4 y la aminopeptidasa

sensible a la puromicina (*PurSA*) presente en células aviares cliva a pVP2 en su C-terminal para generar el intermediario pVP2 de 452 aa (Irigoyen et al. 2012) que es posteriormente procesado en la VP2 madura durante el ensamblado de la partícula viral (441 aa, 37 kDa) (Irigoyen et al. 2009)(Figura 7B).

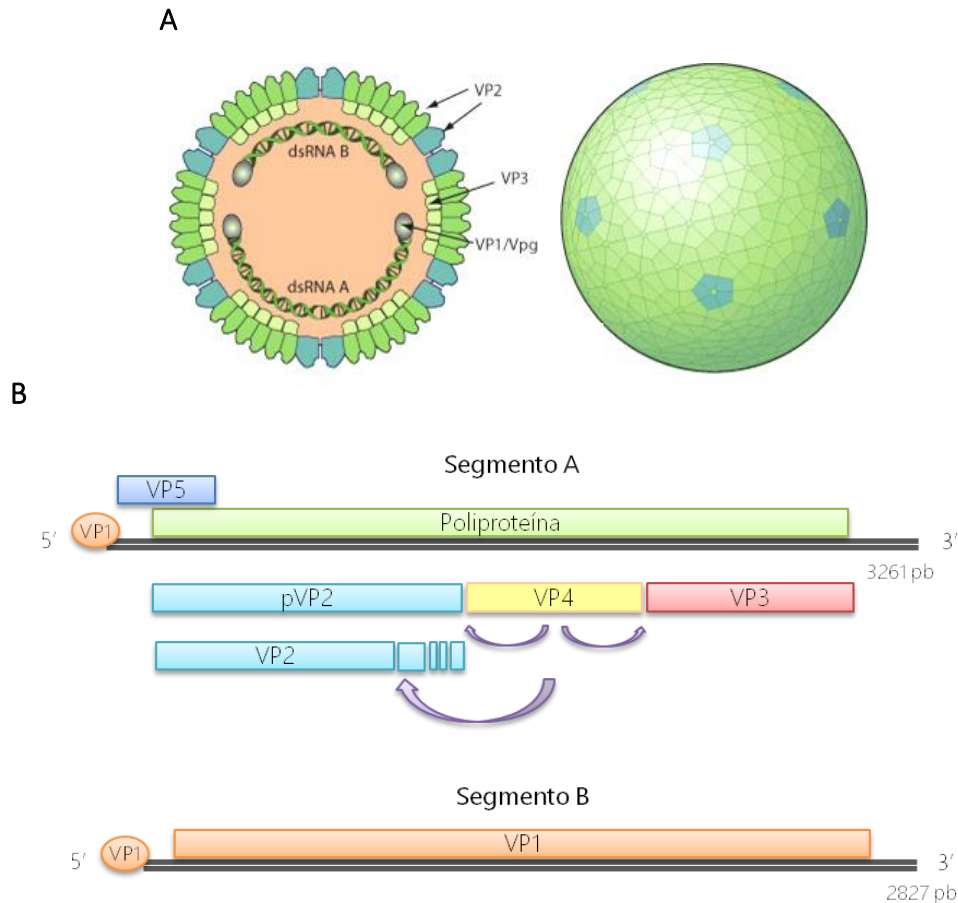


Figura 7: Representación de la partícula viral y proteínas de IBDV. A. La proteína VP2 conforma la cápside de simetría icosaédrica, mientras que VP3 interactúa al mismo tiempo con la cara interna de la cápside y con el genoma viral que consiste en dos segmentos de ARN lineal doble cadena. La proteína VP1 puede encontrarse libre dentro de la partícula viral y asociada al genoma por lo cual también se la denomina *Vpg* (*viral protein genome-linked*). **B.** El segmento A contiene dos marcos de lectura abiertos solapados que codifican para la proteína VP5 y una poliproteína que luego es autoclivada en VP2, VP4 y VP3. El segmento B codifica para VP1 (Adaptado de viral zone: https://viralzone.expasy.org/162?outline=all_by_species).

1.3.2.1 Proteínas de IBDV

Como se mencionó anteriormente, la proteína VP1 codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente responsable de la transcripción y replicación del genoma viral. Esta proteína está presente en el virión de dos formas: como un polipéptido libre y como un polipéptido asociado al extremo 5' de la hebra positiva de ambos segmentos genómicos (Kibenge y Dhama 1997). Por otro lado, se ha reportado que VP1 es uno de los determinantes responsables del fenotipo virulento (Boot et al. 2000, Liu y Vakharia 2004, Escaffre et al. 2013).

VP2 es la única proteína que conforma la cápside de IBDV y es considerada como el principal inductor de la inmunidad protectora en el hospedador ya que contiene los epitopes antigénicos responsables de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Fahey et al. 1989). Es la proteína responsable de la variación antigénica (Brown et al. 1994), el tropismo y la adaptación al cultivo celular y la virulencia (Lim et al. 1999, Mundt 1999, Brandt et al. 2001, Mundt et al. 2002). Además, VP2 es un inductor de la apoptosis (Fernández-Arias et al. 1997).

VP3 tiene capacidad de unir ARN e interactúa consigo misma, con pVP2 y con VP1 (Tacken et al. 2002, Mertens et al. 2015). Esta proteína multifuncional no sólo actúa como andamio durante la morfogénesis de la cápside viral (ver sección 1.3.2.2) (Maraver et al. 2003) sino que además funciona como activador transcripcional de la RdRp (Ferrero et al. 2015). También se ha demostrado que tiene actividad de supresor de la maquinaria de silenciamiento del ARN en plantas (Valli et al. 2012).

La proteína no estructural VP4 es una serin proteasa que además de catalizar la hidrólisis de la poliproteína pVP2-VP4-VP3 en las proteínas virales VP2, VP4 y VP3, resulta esencial para la replicación de IBDV. A través de la unión con la proteína cierre de leucina inducida por glucocorticoides (GILZ) es capaz de suprimir la expresión de interferones de tipo I y aumentar la replicación de IBDV (Li et al. 2013).

VP5 es una pequeña proteína no estructural altamente básica y rica en cisteínas (Yao y Vakharia 2001). Si bien predicciones *in silico* sugerían que se trataba de una proteína de transmembrana de clase II con el extremo N terminal en el citoplasma y el extremo C

terminal expuesto al espacio extracelular (Lombardo et al. 2000), nuestro grupo demostró que VP5 es una proteína asociada a membrana del lado intracelular (Carballeda et al. 2015). Se cree que VP5 juega un rol en el egreso viral no lítico y que, a su vez, posee funciones antiapoptóticas al comienzo de la infección y proapoptóticas luego (Lombardo et al. 2000, Liu y Vakharia 2006, Méndez et al. 2017). Aunque esta proteína no es esencial para la replicación de IBDV en cultivo celular (Mundt et al. 1997), tiene una función en la patogénesis y diseminación viral (Liu y Vakharia 2006, Méndez et al. 2017, Qin y Zheng 2017).

1.3.2.2 Formación de la cápside

VP2 y VP3 son las proteínas estructurales mayoritarias constituyendo aproximadamente el 63 % y el 39 % de la partícula viral respectivamente (Luque et al. 2009). 260 trímeros de pVP2/VP2 componen la única capa de la cápside del virión que tiene simetría icosaédrica T=13 y un diámetro de aproximadamente 70 nm (Böttcher et al. 1997, Castón et al. 2001, Coulibaly et al. 2005). El modelo más aceptado para la morfogénesis de la partícula viral propone en primer lugar la formación de un complejo ribonucleoproteico constituido por la interacción de la proteína VP3 con el ARNdc viral y con VP1. Luego, a través de VP3, el complejo ribonucleoproteico interactúa con pVP2 para ensamblar el virión. Durante este proceso se produce la maduración de VP2, dando como resultado la cápside icosaédrica formada mayoritariamente por la VP2 madura y una cantidad variable de pVP2 (Figura 8). Los péptidos resultantes del clivaje de pVP2 permanecen en el interior de la partícula contribuyendo a la viabilidad del virus y a la entrada del mismo a la célula (Chevalier et al. 2002, Da Costa et al. 2002).

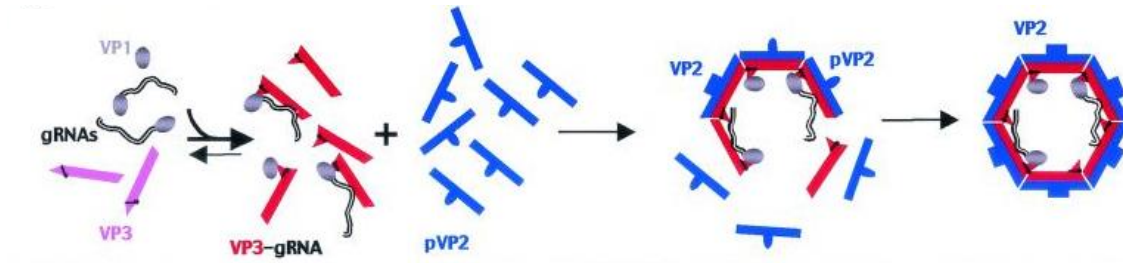


Figura 8: Modelo para la morfogénesis de la partícula viral. La interacción de VP3 con el ARNdc y VP1 forma un complejo ribonucleoproteico que interactúa con pVP2 para ensamblar el virión y completar la maduración de VP2 durante este proceso (Chevalier et al. 2002).

Se ha observado que la expresión del segmento A en sistemas heterólogos produce la formación espontánea de partículas multiméricas con distinta arquitectura. Estas incluyen partículas semejantes a virus (VLP) esféricas e icosaédricas, así como estructuras tubulares de tipo I o tipo II formadas por pVP2 o VP4 respectivamente (Martinez-Torrecuadrada et al. 2000, Castón et al. 2001), las cuales también han sido observadas en células infectadas con IBDV (Granzow et al. 1997). Cuando pVP2 es expresada sola, se observan formas isométricas de 30 nm de diámetro (Chevalier et al. 2002). Por otro lado, la expresión de VP2 madura o su intermediario de 452 aa lleva a la formación de partículas subvirales (SVP) icosaédricas T=1 de 23 nm de diámetro formadas por 20 trímeros de VP2 (Coulibaly et al. 2005, Garriga et al. 2006) (Figura 9).

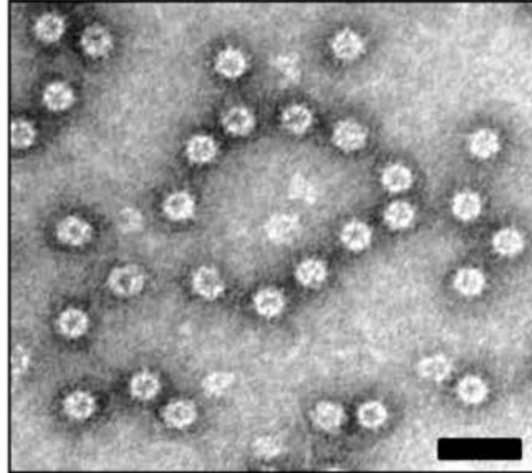


Figura 9: Microscopía electrónica de SVP de IBDV. La expresión de VP2 madura en *Pichia pastoris* genera partículas subvirales que pueden ser purificadas y observadas al microscopio electrónico. La barra representa 50 nm (Taghavian et al. 2013).

1.3.3 PREVENCIÓN

El control de la enfermedad de Gumboro en las granjas de producción avícola se efectúa a través de dos mecanismos muy importantes, la bioseguridad y la vacunación. La estrategia de vacunación más tradicional para hacer frente a esta enfermedad se basa en la hiperinmunización de las gallinas reproductoras, para lograr que los anticuerpos neutralizantes pasen al huevo y protejan a la descendencia durante las primeras semanas de vida; y la posterior vacunación de la progenie, una vez que los niveles de anticuerpos maternos decayeron (Van Den Berg et al. 2000, Chanie y Kegne 2014).

1.3.3.1 Vacunas tradicionales

Las vacunas usualmente utilizadas en los animales jóvenes son vacunas vivas atenuadas basadas en cepas clásicas de IBDV. Estas tienen la ventaja de replicar e imitar la infección en el hospedador induciendo una respuesta inmune celular y humoral sin la adición de adyuvantes (Müller et al. 2012). Además, pueden administrarse en masa en el agua de bebida. Sin embargo, para lograr una inmunización efectiva con estas vacunas es necesario tener en cuenta diversos factores como el tiempo óptimo de vacunación, los niveles de anticuerpos maternos (AcM) y la virulencia del virus de la vacuna. Mientras que

las vacunas basadas en virus de baja virulencia, denominadas tradicionalmente suaves o intermedias, son poco eficientes en presencia de niveles bajos de AcM (Kumar et al. 2000, Rautenschlein et al. 2005), las basadas en cepas más virulentas, las intermedias plus, pueden sobrepasar niveles inclusive altos, pero usualmente generan daño en la bursa de Fabricio y, consecuentemente, distintos grados de inmunosupresión (Ezeokoli et al. 1990, Mazariegos et al. 1990, Rautenschlein et al. 2007). Por otro lado, las cepas atenuadas pueden revertir a virulentas por mutaciones o recombinación de segmentos (Yamaguchi et al. 2000, He et al. 2009, Jackwood 2012). Además, se ha visto en muchos casos que estas vacunas no son capaces de proteger a los pollos contra infecciones con cepas variantes o muy virulentas de IBVD (Tsukamoto et al. 1995, Rautenschlein et al. 2005, Alkhalaf 2009).

Si bien la vacunación en el agua de bebida parecería ser la forma de administración menos laboriosa, la calidad del agua debe monitorearse para que el virus no sea inactivado por restos de desinfectantes y cloro. Además, este método no asegura la administración homogénea de dosis a los animales ya que depende del consumo de agua individual.

La administración parenteral de vacunas, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular, garantiza una aplicación pareja a todos los animales de la dosis vacunal. Sin embargo, este tipo de vacunación es impráctica para vacunaciones masivas debido al tiempo que implica y a la necesidad de personal especializado para realizarla. Por lo tanto, si bien la vía subcutánea es empleada en la administración de vacunas alternativas a las vivas atenuadas en pollos de engorde (ver sección 1.3.3.2), la vía intramuscular suele estar limitada a la aplicación de vacunas inactivadas a las gallinas reproductoras antes de la puesta de huevos, en donde es importante lograr un título alto y uniforme de anticuerpos para pasar a la progenie (Maas et al. 2001).

Las vacunas inactivadas contra IBVD consisten en virus incapaces de replicar debido a que fueron sometidos a calor, radiación o a algún tratamiento químico. Al estar muertos, no pueden producir la enfermedad, pero mantienen la habilidad de generar una respuesta inmune dado que conservan los epitopes antigénicos. Estas vacunas suelen ser costosas y requieren de controles de calidad estrictos para asegurar que el microorganismo haya sido inactivado correctamente (Delrue et al. 2012). Además, suelen ser poco inmunogénicas a

menos que se las combine con adyuvantes y se las administre en varias dosis o sean aplicadas como refuerzo luego de una primovacuna con virus vivo (Müller et al. 2012). Es por eso que, como se mencionó antes, son utilizadas para el plantel de gallinas reproductoras que recibieron durante las primeras semanas de vida alguna dosis de vacuna viva atenuada.

1.3.3.2 Vacunas alternativas

En las últimas décadas se ha avanzado en el desarrollo de vacunas de nueva generación que generen una respuesta inmune adecuada, sean seguras y cuya aplicación sea compatible con la producción a gran escala.

Prácticamente todos los desarrollos vacunales han empleado a la proteína de cápside VP2, debido a que contiene los determinantes antigénicos más importantes del virus, responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el mismo (Yamaguchi et al. 1996, Letzel et al. 2007). Entre estos se encuentran las vacunas a ADN, las vacunas vivas vectorizadas, los complejos inmunes y las vacunas proteicas a subunidad (ver revisión de Müller et al. 2012, Lucero et al. 2012, Rautenschlein y Alkie 2016). Muchos candidatos vacunales han sido ensayados en el laboratorio con éxito variable pero muy pocos han sido probados a campo. Sin embargo, algunas de estas vacunas de nueva generación han logrado llegar al mercado y se detallarán más adelante.

Es posible inducir una respuesta inmune contra un antígeno a través de la transferencia de ADN desnudo que codifique para el gen de interés en células del hospedador. Este método es seguro, fácil y económico y no se ve afectado por la presencia de anticuerpos maternos. En general los plásmidos de ADN son efectivos en inducir respuestas celulares T citotóxicas, aunque también se ha reportado la inducción de respuestas humorales (Chang et al. 2001, Hsieh et al. 2010). Estas vacunas son generalmente administradas por vía parenteral, y tienen la desventaja de que se necesitan múltiples dosis de alta concentraciones de ADN para lograr una respuesta inmune efectiva. En pollos, se ha ensayado la efectividad de la administración de plásmidos que codifican para VP2 o la poliproteína como vacuna contra IBDV con resultados diversos. Estas parecen

funcionar mejor cuando son administradas como prime *in ovo* o en pollos jóvenes, seguido por algún refuerzo heterólogo (Haygreen et al. 2006, Hsieh et al. 2007).

Otra forma de transferencia del gen de interés al organismo que se desea vacunar ha sido a través de la inserción del mismo en el genoma de bacterias o virus que funcionan como vehículo. Estas vacunas vectorizadas resultan interesantes ya que admiten la posibilidad de lidiar con dos enfermedades utilizando la misma herramienta sanitaria. Se han ensayado bacterias como *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli* para suministrar el gen *vp2* o la poliproteína como vacuna oral. Sin embargo, las tasas de éxito han sido variables. Una posible limitante para este método de *delivery* es la secreción y/o traslocación de las proteínas virales a través de las paredes bacterianas (Dieye et al. 2003, Li et al. 2006, Mahmood et al. 2007).

La utilización de vectores virales vivos como vacunas ha sido una de las estrategias más exitosas para reemplazar las vacunas vivo-atenuadas en la industria avícola. Se han utilizado fowlpoxvirus, canarypoxvirus, adenovirus aviars, el virus de la enfermedad de Newcastle, Herpesvirus de pavo (HVT) y el virus de la enfermedad de Marek, entre otros, como vectores virales para expresar VP2 de IBDV (ver revisión en Lucero et al. 2012). Desde hace algunos años se comercializan dos vacunas vectorizadas, VAXXITEK® HVT+IBD (Merial) y Vectormune® HVT IBD (Ceva), que, como sus nombres lo indican, utilizan un virus de herpes de pavo recombinante que codifica antígenos de IBDV para estimular simultáneamente una respuesta inmune contra la enfermedad de Marek e IBD. Además, recientemente, se lanzó al mercado la vacuna R-VAC INMUNER IBD desarrollada en el Instituto de Biotecnología del INTA y producida por Laboratorios Inmuner que utiliza un poxvirus recombinante que lleva en su genoma el gen *vp2*.

Si bien no puede ser clasificada como una vacuna recombinante, otra herramienta sanitaria que ha comenzado a ser utilizada en el campo en los últimos años es el “complejo inmune” que se obtiene a partir de la mezcla de una cantidad específica de anticuerpos obtenidos de sueros de pollos hiperinmunizados contra Gumboro junto con una vacuna viva de IBDV.

Tanto las vacunas virales vectorizadas como los complejos inmunes han demostrado ser efectivas en la presencia de AcM suscitando protección contra diferentes patotipos de IBDV al ser inoculadas en una sola dosis *in ovo* o subcutánea a pollos de 1 día de edad (Haddad et al. 1997, Kelemen et al. 2000, Perozo et al. 2009, Gelb et al. 2016, Prandini et al. 2016). Aunque las vacunaciones *in ovo* y subcutánea permiten una administración más homogénea, éstas requieren máquinas para inyectar huevos, que no están presentes en todas las granjas, o personal entrenado. Dichos requerimientos, junto con que ambas vacunas son más costosas que las vivas atenuadas, constituyen algunas de las razones por las cuales las vacunas tradicionales no han sido reemplazadas todavía.

Por último, inmunógenos proteicos basados en la producción de VP2 o, en menor medida, la poliproteína recombinante, también han sido ensayados como vacunas contra IBDV. Dado que son antígenos no replicativos presentan desventajas similares a las vacunas inactivadas en cuanto a eficiencia. Sin embargo, al no tener que lidiar con el patógeno entero, estas vacunas a subunidad son más seguras y, dependiendo del sistema de expresión elegido, tienen la potencialidad de ser más económicas. Actualmente existe en el mercado una vacuna bivalente, Gumbin®VP2 (Phibro Animal Health Corporation), que consiste en NDV inactivado junto con VP2 recombinante producida en levaduras (Pitcovski et al. 2003). La misma está destinada a la vacunación de pollos que fueron inmunizados primeramente con vacunas vivas de la enfermedad de Newcastle y de Gumboro.

Los sistemas que han sido utilizados para la expresión de VP2 son *E. coli*, levaduras, baculovirus/células de insecto y plantas (ver revisión en Lucero et al. 2012). Todos ellos tienen diferentes características que están resumidas en la Tabla 2. Aunque los cultivos celulares de células de mamíferos o aves no son usados para expresar VP2 recombinante, sí son utilizados para propagar los virus de las vacunas vivas atenuadas o inactivadas y los vectores virales, por lo tanto, son incluidos en la comparación:

Sistema de expresión	Bacterias	Levaduras	Plantas	Baculovirus/ células de insecto	Cultivos celulares (mamíferos/aves)
Tiempo de producción	Corto	Medio	Extenso (expresión estable) Corto (expresión transitoria)	Extenso	Extenso
Costo de producción	Bajo	Medio	Bajo	Alto	Alto
Capacidad de escalado	Alta	Alta	Muy alta	Media	Baja
Costo de manenimiento	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Alto
Rendimiento	Alto	Alto	Medio/Alto (si se utilizan vectores virales)	Alto	Medio/Alto
Riesgo/tipo de contaminación	Endotoxinas	Bajo	Bajo	Bajo	Virus

Tabla 2: Comparación de diferentes sistemas de producción para la expresión de proteínas recombinantes.

1.4 LAS PLANTAS COMO SISTEMAS DE EXPRESIÓN

En los últimos años las plantas han emergido como sistemas de producción de vacunas a subunidad alternativos ya que contribuyen con ciertas características deseables en una vacuna como seguridad, inmunidad protectora, estabilidad, fácil administración, bajo costo y pocos efectos secundarios.

Los sistemas de expresión de plantas no albergan patógenos animales o toxinas microbianas y, por lo tanto, hay un bajo riesgo de transmisión de estos contaminantes junto con la vacuna (Hongli et al. 2013). El costo de mantenimiento de las plantas es bajo ya que pueden ser crecidas a campo, en un invernadero o incluso en un laboratorio si es necesario, de forma económica y pueden ser fácilmente escalables (Chen y Davis 2016). Otra ventaja de este sistema es la factibilidad de obviar la cadena de frío ya que la proteína de interés puede ser almacenada en tejidos donde las mismas son estables a temperatura ambiente (Lau y Sun 2009, Boothe et al. 2010). Además, las plantas tienen la habilidad de expresar no

solamente proteínas simples sino complejos multiméricos con un plegamiento y ensamblado correcto y patrones similares de glicosilación. Estas características contribuyen a la fidelidad de las propiedades antigénicas de la proteína original apoyando su viabilidad como candidatos vacunales (Korban 2005).

1.4.1 EXPRESIÓN ESTABLE VS EXPRESIÓN TRANSITORIA

Existen dos estrategias básicas para la expresión de proteínas en plantas: la expresión que implica la modificación genética nuclear o plastídica y la expresión transitoria que involucra la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* y vectores virales.

En la transformación estable, el transgén se integra al genoma de la planta en forma azarosa incrementando la estabilidad genética con posibilidad de pasar a la descendencia. Sin embargo, los niveles de expresión o incluso las características fenotípicas de la planta resultante pueden ser afectados dramáticamente por el contexto cromosómico del sitio en el que se inserta el transgén (Kumar y Fladung 2001). Además, es común que se integren varias copias del transgén en el genoma y se desencadene silenciamiento transcripcional y post-transcripcional que afectan la síntesis de la proteína heteróloga (Fagard y Vaucheret 2000). Por otro lado, aunque las plantas transgénicas representan una fuente de propagación estable y económica, el desarrollo y selección de una línea transgénica puede llevar muchos meses y la obtención de altos rendimientos a veces no es posible (Rybicki 2009). Resulta claro que mejorar los niveles de expresión en las plantas transgénicas representa uno de los mayores desafíos a vencer a fin de establecerlas como biorreactores capaces de competir con los sistemas tradicionales, como ser las bacterias y las levaduras (Laere et al. 2016). Finalmente, el desarrollo de una vacuna producida a partir de plantas transgénicas implica la obtención de la aprobación regulatoria, no sólo de SENASA, sino también de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), al igual que cualquier organismo genéticamente modificado (OGM) y con posibilidad de impactar negativamente en la opinión pública.

El uso de plataformas de expresión transitorias basadas en *A. tumefaciens* y/o virus de plantas permite superar algunos de los problemas regulatorios y de percepción pública que

tienen los organismos genéticamente modificados (Chen y Lai 2015). Además, estos sistemas permiten una rápida producción de altos niveles de proteínas recombinantes evitando los tiempos largos necesarios para la generación de plantas transgénicas. Finalmente, en los últimos años, estos métodos han sido optimizados mediante el uso conjunto de supresores del silenciamiento génico, vectores de última generación y la agroinfiltración de amplicones virales utilizando *A. tumefaciens* (Gleba et al. 2005, Sainsbury et al. 2009, Peyret y Lomonosoff 2013, Jin et al. 2015). Debido a su alto rendimiento, la expresión transitoria se perfila como una de las metodologías favoritas para su aplicación en la industria.

En virtud de las ventajas enumeradas previamente, para el desarrollo de esta tesis se eligió la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* como plataforma para la obtención de un inmunógeno recombinante que pudiese ser utilizado como vacuna para la enfermedad de Gumboro.

Hipótesis y objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Frente a la necesidad de reemplazar las vacunas convencionales por inmunógenos de nueva generación que sean más seguros y efectivos surge este trabajo de tesis doctoral cuya **hipótesis general** es que la proteína VP2 producida en plantas conserva sus epitopes antigénicos y la facultad de formar partículas subvirales, siendo capaz de generar una respuesta inmune protectora frente a la infección con IBDV, constituyendo una alternativa viable a las vacunas usadas tradicionalmente.

El **objetivo general** del trabajo de tesis es la obtención de una vacuna a subunidad para la enfermedad infecciosa de la bursa producida *in planta*.

Los **objetivos específicos** propuestos son:

1. Obtener el inmunógeno recombinante a partir de la expresión de la proteína VP2 de IBDV en *Nicotiana benthamiana* y evaluar su inmunogenicidad y capacidad protectora en pollos SPF tras la inoculación por distintas vías.
2. Determinar si la VP2 producida en plantas es capaz de formar partículas subvirales (SVP) en este sistema.
3. Evaluar la eficacia del inmunógeno recombinante con respecto a una vacuna inactivada comercial en gallinas de producción avícola a través del estudio de los títulos y la cinética de los anticuerpos maternos en la descendencia.

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 VIRUS

El aislamiento argentino de campo de IBDV LD-847-04, gentilmente proporcionado por el Dr Delamer (Empresa Delamer S.R.L., Argentina), fue utilizado para amplificar la región codificante de VP2.

Para realizar los desafíos de los distintos experimentos se utilizaron dos cepas virales de de IBDV de incrementada virulencia a medida que se encontraron disponibles en el laboratorio. Las cepas utilizadas fueron: LZD, cepa clásica vacunal de virulencia intermedia obtenida de Laboratorios Inmuner (Entre Ríos, Argentina) y cepa vacunal Winterfield 2512, de virulencia intermedia plus (Ceva Salud Animal, Bs.As., Argentina).

3.1.2 CEPAS BACTERIANAS

En primera instancia se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α para clonar y amplificar las construcciones obtenidas y posteriormente se empleó la cepa Gv3101::pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* para infectar las plantas.

3.1.3 PLANTAS

Se utilizaron plantas *Nicotiana benthamiana* de 5-6 semanas para agroinfiltrar las distintas construcciones y obtener el material biológico para los experimentos de inmunización. Las plantas se mantuvieron en invernáculos del Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA (Bs.As., Argentina) con un período de 16 h de luz y 8 h de oscuridad bajo lámparas de 500 W.

3.1.4 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) provistos por el Servicio de Cultivos Celulares del Instituto de Virología, CICVyA, INTA (Bs.As., Argentina) para realizar las amplificaciones y titulaciones virales de las cepas vacunales LZD y Winterfield y para los ensayos de aislamiento viral de IBDV a partir de bursa.

3.1.5 ANIMALES

Se utilizaron dos razas de pollos para los distintos experimentos. Para los experimentos con animales libres de patógenos específicos (SPF) se utilizaron pollos de raza White Leghorn, que fueron adquiridos en estado de huevos embrionados en la empresa Rosenbusch S.A. (Rosenbusch, CABA, Argentina) e incubados durante 21 días a 37 °C con 50 % de humedad en incubadoras Yonar 80/AD (Yonar, CABA, Argentina). Para los experimentos en gallinas reproductoras y en su descendencia, se utilizaron madres de la raza Plymouth Rock Barrada criadas en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Pergamino, INTA (Bs.As., Argentina). Las gallinas y parte de su progenie se mantuvieron en la EEA. Otra parte de los huevos embrionados fueron trasladados al Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA para su incubación y nacimiento de los animales.

Una vez nacidos, los animales se mantuvieron bajo lámpara por 1-2 semanas para luego ser alojados en jaulas individuales. A los pollos se les suministró alimento y agua *ad libitum* hasta la finalización de cada experiencia.

Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo en el bioterio del Instituto de Biotecnología, en condiciones adecuadas para la especie.

3.2 AMPLIFICACIONES Y TITULACIONES VIRALES

3.2.1 LZD

La vacuna a virus atenuado LZD fue obtenida de los Laboratorios Inmuner liofilizada y fue resuspendida según las instrucciones del fabricante en el diluyente provisto con la misma antes de los desafíos virales.

3.2.2 WINTERFIELD

3.2.2.1 Amplificación viral

Brevemente, partiendo de botellas T175 conteniendo 1×10^6 cél/ml de FEP, se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X. Posteriormente cada botella fue inoculada con 1,5 ml conteniendo 1×10^5 Unidades Formadoras de Placa (UFP) en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (MEM-D) (Gibco, Carlsbad, CA, EEUU). Se incubaron las botellas inoculadas durante 1 hora a 37 °C, 5 % CO₂, agitándolas cada 15 minutos para cubrir homogéneamente la monocapa celular. Finalmente, se agregó a cada

botella 35 ml de medio de mantenimiento conteniendo MEM-D, suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Mercedes, Bs. As., Argentina) al 2 %, HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) 25 mM y antibiótico/antimicótico (Gibco) y se incubó a 37 °C con 5 % CO₂ hasta ver 95-100 % de efecto citopático (ECP) al microscopio (4-5 días). Llegado ese momento, los cultivos fueron cosechados y sometidos a 3 ciclos de congelado/descongelado, alicuotados y guardados a -80 °C hasta su utilización.

3.2.2.2 Titulación de stocks virales

En primera instancia, se sembraron placas de 96 pocillos fondo plano con FEP a razón de $1,5 \times 10^4$ cél/pocillo y se incubaron durante 16 h a 37 °C con 5 % de CO₂. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas al décimo del stock viral a titular, y se sembraron 25 µl de cada dilución por cuadruplicado, dejando una fila de células sin infectar (control). Las células se incubaron con las diluciones de virus durante 1 hora a 37 °C. Finalizada esa etapa se descartaron los inóculos y se añadieron 100 µl de medio de mantenimiento (MEM-D, HEPES 1X, antibiótico 1X, SFB 2 %) por pocillo, quedando las placas en incubación a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 4 días. Finalmente, se observaron las células al microscopio en búsqueda de efecto citopático y se anotaron los pocillos positivos y negativos para tal efecto. El título viral se calculó por el método de Reed & Muench (1938) y se expresó como TCID₅₀/ml.

3.3 CLONADO DE VP2 EN pEAQ

En el laboratorio se contaba con la construcción pBINVP2 conteniendo la secuencia de la VP2 madura (441 aa) clonada en un vector binario pBINPLUS (ImpactVector™, Wageningen UR, Netherlands) río abajo del promotor de rubisco y río arriba de los tags c-myc e his (Gómez et al. 2013). Además, se contaba con el vector pBINGFP para ser utilizado como control negativo. Durante el desarrollo de la tesis se obtuvo la serie de vectores pEAQ de alta expresión en plantas (Sainsbury et al. 2009, Peyret y Lomonosoff 2013) a través de un acuerdo de transferencia de material con lo cual se procedió a subclonar VP2, sin tags, en este nuevo vector con el fin de mejorar los niveles de expresión. Entre los vectores pEAQ provistos se encontraba el pEAQGFP que fue utilizado como control negativo en los experimentos en animales.

3.3.2 PCR

Se amplificó VP2 a partir del pBINVP2 utilizando los primers fw VP2 Agel y rv VP2-441 XhoI que poseen en su región 5' los sitios de restricción indicados.

Nombre	Secuencia
fw VP2 Agel	<u>ACCGGT</u> ATGACAAACCTGCAA
rv VP2-441 XhoI	CTCGAG <u>TTATG</u> CTCCTGCAATCT

Para la reacción de PCR se utilizaron 0,5 µl del plásmido pBINVP2 como templado, 5 µl de *buffer* 10X correspondiente, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 60 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido, 0,2 µl de Taq Platinum (2U) (Thermo Fisher Waltham, MA, EE.UU.) y agua destilada estéril hasta 50 µl. Las reacciones se efectuaron en un termociclador Biometra.

El perfil de PCR empleado fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	3'	1
94 °C	1'	35
58 °C	1'	
72 °C	1'30"	
72 °C	5'	1

Parte del producto de PCR fue resuelto en gel de agarosa al 1 % y el fragmento visualizado por tinción con bromuro de etidio.

3.3.3 CLONADO EN pGEMT-easy

Una vez visualizados el fragmento en geles de agarosa, se escindió la banda correspondiente y se purificó mediante el kit Qiaex purification system (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 8.

El fragmento purificado fue clonado en el vector pGEMT-easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Para ello, se ligó el inserto al plásmido utilizando 50 ng de vector y una relación molar vector: inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl con *buffer* de ligado y en presencia de 3 U de enzima T4 ADN ligasa (Promega). La reacción se incubó a 16 °C toda la noche.

A continuación, el vector plasmídico obtenido fue introducido en bacterias competentes mediante *shock* térmico. Durante 16 h se crecieron las bacterias en medio Luria-Bertani (LB) sólido en presencia de ampicilina 50 mg/ml, X-gal 20 mg/ml e IPTG 100 mM. Las colonias blancas fueron picadas y crecidas en medio líquido LB en presencia de 100 mg/ml de ampicilina.

Se realizó una minipreparación del ADN plasmídico de los clones positivos utilizando columnas comerciales (Qiagen) a partir de 5 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas, rindiendo aproximadamente una cantidad de 2 µg de ADN. El ADN purificado fue eluido de la columna con una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 8.

La presencia e identidad del inserto fue confirmada por clivaje con enzimas de restricción y/o secuenciación automática. El clon elegido se conservó a -70 °C en presencia de 15 % glicerol.

3.3.4 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para las digestiones con enzimas de restricción de los diferentes plásmidos se utilizaron 500 ng de ADN, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado en un volumen final de 30 µl. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 h a la temperatura recomendada para cada enzima.

3.3.5 CLONADO EN pEAQ

Mediante reacción de restricción con las enzimas AgeI y XhoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) se obtuvo el fragmento *vp2* a partir del plásmido pGEMT-VP2. Del mismo modo se linearizó el vector pEAQ quedando flanqueado por ambos sitios.

El clonado y el análisis de los clones positivos se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente con la salvedad de que los cultivos bacterianos fueron crecidos en medio LB en presencia de 100 mg/ml de kanamicina debido a que el plásmido pEAQ posee el gen de resistencia *npt II*.

El vector pEAQ aporta a la construcción los bordes derecho e izquierdo necesarios para la transferencia del material genético desde la bacteria a la célula vegetal.

3.4 OBTENCIÓN DE LA AGROBACTERIA RECOMBINANTE

Las agrobacterias competentes fueron transformadas con el pEAQVP2 por electroporación. Brevemente, se mezclaron 50 μ l de bacterias electrocompetentes con 50 ng de vector de transferencia. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación (electrodo de 0,2 cm, BioRad) donde fue sometida a 2,5 volts, 25 μ FD de capacitancia y 400 Ω de resistencia en un electroporador (BioRad Gene PulserTM). Inmediatamente se agregó medio LB y las bacterias se recuperaron a 28 °C durante 2 h en agitación (200 rpm). Luego se plaquearon en medio LB sólido en presencia de 100 μ g/ml de rifampicina, 40 μ g/ml de gentamicina y 100 μ g/ml de kanamicina.

Algunas de las colonias obtenidas fueron crecidas en medio líquido con los mismos antibióticos durante 48 h a 28 °C en agitación y conservados en medio LB con antibióticos y 15 % de glicerol a -70 °C hasta su uso.

3.5 TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE *N. BENTHAMIANA* POR AGROINFILTRACIÓN

Las colonias de *A. tumefaciens* cepa GV3101 que contenían las construcciones de interés fueron crecidas en medio LB suplementado con los antibióticos indicados anteriormente por 48 h a 28 °C. Luego, 25 ml de medio de cultivo (medio LB suplementado y antibióticos) fue inoculado con 250 μ l del cultivo *starter* (crecido durante 24 h) y posteriormente crecido a 28 °C durante 18 h. El cultivo se centrifugó para recuperar las células a 3600 x g y temperatura ambiente (TA). El *pellet* fue resuspendido en *buffer* de infiltración (10 mM (N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 10 mM MgCl₂) conteniendo 100 μ M de hormona acetosiringona, hasta alcanzar una DO_{600nm} ~ 1. Las bacterias resuspendidas se incubaron a temperatura ambiente por 3-4 h con leve agitación cada media hora para promover la inducción de los genes de virulencia.

Una vez inducidos los genes de virulencia, se cargó una jeringa de 1 ml sin aguja con la suspensión de bacterias inducidas. Sobre la cara abaxial de las hojas de *N. benthamiana*, y haciendo presión con el dedo por el otro lado de la misma, se descargó el material suavemente evitando la rotura del tejido. El procedimiento se repitió de manera de infiltrar la hoja en toda su extensión (Figura 10).

Como control de agroinfiltración se utilizaron plantas infiltradas con bacteria recombinante para la construcción pBINGFP o pEAQGFp.



Figura 10: Agroinfiltración de *N. benthamiana*: Sobre la cara abaxial de las hojas y haciendo presión con el dedo por el otro lado de la misma, se descargó suavemente evitando la rotura del tejido la suspensión de agrobacterias recombinantes con una jeringa de 1 ml sin aguja.

3.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para el primer experimento en animales las hojas agroinfiltradas con la construcción pBINVP2 o pBINGFP como control, se pulverizaron en mortero con nitrógeno líquido. Las proteínas totales fueron extraídas con 3 volúmenes de *buffer* de extracción (100 mM Sodium acetate pH 4, 1 mM EDTA, 5 % glycerol, 0,5 % NP40 y cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). Luego de 30 minutos en hielo, las muestras fueron centrifugadas por 30 minutos a 20000 x g y se tomaron los sobrenadantes que se llevaron a pH 7 y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

Para los experimentos subsiguientes las hojas agroinfiltradas con pEAQVP2 o pEAQGFp fueron trituradas en licuadora con 3 volúmenes de PBS frío 1X pH 7,4, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y antifoam 0,04 %. Luego las muestras fueron filtradas por gasa y centrifugadas 15 minutos a 9000 x g. Los sobrenadantes fueron utilizados para sembrar un gradiente discontinuo de sacarosa con el fin de semipurificar y concentrar las partículas subvirales para su observación en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y para su utilización en los experimentos con animales (ver siguiente sección).

3.7 SEMIPURIFICACIÓN DE PARTICULAS SUBVIRALES

Se aplicó un protocolo modificado basado en la ultracentrifugación en colchón de sacarosa para la preparación de las SVP y la muestra control (Peyret 2015). Se procesaron

25 g de hojas infiltradas como se explicó en la sección anterior. El sobrenadante obtenido de la centrifugación se filtró de nuevo a través de una membrana de 0,45 μm en un dispositivo de filtro y se cargó sobre dos capas de sacarosa, 25 % (2 ml) y 70 % (0,5 ml) p/v. Se ultracentrifugó a 39000 rpm en un rotor SW41Ti (Beckman) a 4 °C durante 2:40 h.

Se tomaron la interfase y la fracción de 70 % y se dializaron en conjunto contra PBS 1X en una cámara fría en tres etapas (primera noche, 7 h y segunda noche) cambiando el buffer cada vez. Las SVP obtenidas fueron observadas al microscopio electrónico. A su vez, se tomó una muestra de cada paso de la purificación para su posterior análisis por Western Blot y tinción con azul de Coomassie. Las muestras se mantuvieron a -70 °C hasta su uso y se clarificaron antes de ser utilizadas. El mismo procedimiento de purificación se llevó a cabo con las hojas infiltradas con GFP para obtener una muestra negativa.

3.8 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las SVP se cargaron en una grilla de cobre y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2 %. Las grillas se observaron en el microscopio electrónico (CM 200, PHILIPS) a 160 kV. El análisis de las imágenes se realizó con el software OLYMPUS ITEM.

3.9 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.9.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para separar las proteínas obtenidas se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida de concentración 12 %. Las muestras se hirvieron con cracking buffer 5X (5 % SDS, 50 % glicerol, 25 % 2-mercaptoetanol, 0,02 % azul de bromofenol y 0,3125 M Tris HCl, pH 6,8), se sembraron en minigeles (8 x 8 cm) y se corrieron a voltaje constante (100 V) en buffer Laemmli (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %). Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de Coomassie o se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa para ensayos de Western blot.

3.9.2 ELECTROTRANSFERENCIA

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron equilibrados en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %) junto con la membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Se montó el cassette dentro de la cuba (BioRad), se llenó con buffer de transferencia y se aplicó una corriente constante de 200 mA a TA por 1,5 h.

3.9.3 DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron 1 h a TA en solución de bloqueo TBST-leche (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %, leche descremada 4 %). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %) y se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo policlonal anti-VP2 obtenido en conejos en el laboratorio en buffer de dilución TBST-leche descremada 3 %. Tras 1 hora de incubación a TA se recuperó la dilución de anticuerpo y se lavaron las membranas 3 veces con solución de lavado TBST por 5 min cada vez. Se incubaron entonces con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). Tras 1 h de incubación a TA con agitación suave, se descartó la dilución del segundo anticuerpo y se lavaron las membranas 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 5 min cada vez. El proceso de revelado se llevó a cabo utilizando el NBT/BCIP (Promega) e incubándose hasta la aparición de color.

3.9.4 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Se incubaron los geles en una solución de azul de Coomassie 0,05 % (Coomassie Brilliant Blue R 250 0,05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) por 1 o 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante mediante incubación en solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %), que se reemplazó reiteradas veces. El gel se decoloró hasta que las bandas proteicas se visualizaron con nitidez.

3.9.5 CUANTIFICACIÓN DE VP2

Las concentraciones de la proteína VP2 presente en los extractos crudos de plantas o en las SVP semipurificadas se estimaron por comparación con una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras de interés junto con diluciones seriadas al medio de BSA (desde 250 ng/ul hasta 31,125 ng/ul) se resolvieron en geles de poliacrilamida que posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie como se describió previamente. Las imágenes de los geles fueron tomadas con el G:BOX (Syngene) y las bandas visualizadas se analizaron con el Gel-Pro Analyzer software v3.1.

3.10 EXPERIMENTOS EN ANIMALES

Todos los ensayos en animales contaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA-INTA (procedimientos aprobados N° 63/2014, N° 13/2016 y N°/2017)

3.10.1 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE VP2 PRODUCIDA EN PLANTAS POR DISTINTAS VÍAS

Los inmunógenos consistieron en extractos proteicos obtenidos de hojas agroinfiltradas con pBINVP2 o pBINGFP (control negativo) obtenidos como se describe en la sección 2.6.

Cincuenta y cuatro animales SPF de 21 días de edad fueron divididos al azar en 6 grupos (n=9) e inoculados con los inmunógenos recombinantes por distintas vías en un esquema dosis/refuerzo a los 0 y a los 14 días post inoculación (dpi) como se muestra a continuación:

1. *VP2 im*: dos dosis intramusculares (im.) de 250 µl de extracto de planta conteniendo 7,5 µg de VP2.
2. *VP2 nasal*: 2 dosis intranasales (in.) de 250 µl de extracto de planta conteniendo 7,5 µg de VP2.
3. *VP2 oral*: 2 dosis orales de 250 µl de extracto de planta conteniendo 7,5 µg de VP2.
4. *Control im*: dos dosis im. de 250 µl de extracto de planta conteniendo GFP.
5. *Control nasal*: dos dosis in. de 250 µl de extracto de planta conteniendo GFP.
6. *Control oral*: dos dosis orales de 250 µl de extracto de planta conteniendo GFP.

Para las inoculaciones intranasales, los 250 μ l se dividieron en 3 dosis de 80-85 μ l que fueron administradas a lo largo del mismo día.

Los animales fueron sangrados a los 11, 21 y 32 dpi por la vena del ala con heparina, y los plasmas obtenidos se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Tres semanas después de la segunda inmunización, 6 animales de cada grupo fueron desafiados por vía oral con 500 μ l de IBDV cepa LZD (6934 TCID₅₀/ml) y sacrificados a los 5 días. Las bursas de Fabricio fueron removidas para posterior análisis histopatológico, citometría de flujo y aislamiento viral.

3.10.2 EVALUACIÓN DE UNA DOSIS MAYOR DEL INMUNOGENO POR VÍA ORAL

El inmunógeno consistió en extracto de hojas agroinfiltradas con pEAQVP2, o con pEAQGFP como control negativo, concentrado por ultracentrifugación.

Veinticuatro pollos SPF de 15 días de edad fueron divididos al azar en 4 grupos (n=6) e inoculados por vía im. u oral con las SVP en un esquema dosis/refuerzo a los 0 y 14 dpi como se muestra a continuación:

1. *VP2 im./im.*: dos dosis por vía intramuscular con 30 μ g de VP2.
2. *VP2 im./oral*: una dosis por vía intramuscular seguido de una dosis por vía oral con 30 y 60 μ g de VP2.
3. *VP2 oral/oral*: dos dosis por vía oral con 60 μ g de VP2.
4. *GFP*: 2 animales recibieron 2 dosis de GFP por vía im., otros 2 animales recibieron una dosis de GFP por vía im. y otra por vía oral, y los 2 últimos animales recibieron 2 dosis de GFP por vía oral. Los volúmenes inoculados fueron equivalentes a los que recibieron los otros grupos.

Los animales fueron sangrados a los 10, 20 y 30 días con heparina y los plasmas obtenidos se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Tres semanas luego de la inmunización, todos los animales fueron desafiados con 500 μ l de IBDV cepa Winterfield (6,3 x 10⁹ TCID₅₀/ml) y sacrificados a los 5 días.

Las bursas fueron removidas para posterior análisis histopatológico, citometría de flujo y aislamiento viral.

3.10.3 EVALUACIÓN DEL INMUNÓGENO COMO ALTERNATIVA A LA VACUNA INACTIVADA

El inmunógeno consistió en un extracto proteico obtenido de hojas agroinfiltradas con pEAQVP2 descrito anteriormente.

Para este ensayo se utilizaron gallinas de la raza Plymouth Rock Barrada que se encontraban en la EEA Pergamino, INTA y que habían recibido dos dosis de vacuna viva atenuada contra IBDV a las 4 y 7 semanas, según el esquema tradicional de vacunación. La raza Plymouth Rock Barrada es una estirpe de gallinas pesadas del componente aves del programa ProHuerta, destinada a la producción de huevos. A las 18 semanas de edad, y antes del comienzo del período de postura, sesenta gallinas fueron separadas al azar en 3 grupos experimentales e inoculadas intramuscularmente como se detalla a continuación:

1. *Sin refuerzo*: no recibieron ninguna inoculación de refuerzo (control negativo).
2. *VP2*: 500 µl de extracto de planta conteniendo 30 µg de VP2.
3. *Vacuna inactivada*: una dosis de vacuna inactivada comercial (control positivo).

Las gallinas se mantuvieron en la EEA y fueron sangradas antes de la inmunización y a las 3, 9 y 28 semanas post inmunización. Los sueros se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Cuando las gallinas comenzaron a poner huevos del tamaño adecuado, aproximadamente a las 12 semanas post inoculación, las mismas fueron inseminadas y se recolectaron sus huevos durante los días subsiguientes.

Los huevos fueron puestos a incubar a 37 °C todos juntos al final del período de recolección en la EEA Pergamino. Los pollitos BB nacidos, aproximadamente 30 por grupo, fueron sangrados semanalmente sin heparina durante 4 semanas para estudiar la inmunidad pasiva. Los sueros fueron trasladados al Instituto de Biotecnología donde se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

3.11 PANEL DE PRUEBAS PARA EXPERIMENTOS CON ANIMALES

3.11.1 ELISA

3.11.1.1 Kit comercial

Se utilizó el kit comercial IDEXX IBD Ab (IDEXX, Westbrook, MA, EEUU) para la medición de anticuerpos totales anti-IBDV en el cual los sueros incógnita deben diluirse 1/500 y el título se calcula según las instrucciones del fabricante.

3.11.1.2 ELISA INTA

El ELISA INTA es un test desarrollado en nuestro laboratorio (Cassani 2017). Se trata de un ELISA indirecto en el cual las placas se tapizan con SVP expresadas en *N. benthamiana* y posteriormente semipurificadas.

Brevemente, placas de 96 pocillos fondo plano Nunc Maxisorp™ (Invitrogen) fueron tapizadas con SVP resuspendidas en buffer carbonato/bicarbonato (pH 9,6) a razón de 96 ng/pocillo, y fueron mantenidas durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, las placas fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS-T 5 % leche) durante 1 hora a TA en agitación. Las muestras de suero a evaluar se diluyeron en buffer PBS con suero normal equino en un factor de 1:400 y se sembraron en las placas, que fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C en agitación. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario anti-especie conjugado a HRP (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, EEUU) en dilución 1:4000, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación. Luego de 3 lavados con PBST, se añadió la solución de revelado (ABTS, H₂O₂ y buffer Citrato, pH 5) y las placas se incubaron a TA en oscuridad. La lectura se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

3.11.2 SERONEUTRALIZACIÓN POR DILUCIÓN LÍMITE

Los sueros obtenidos en la última sangría pre-desafío de cada experimento fueron incubados a 56 °C por 30 min para la inactivación del complemento. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas al medio de los sueros, que fueron incubadas con 50 TCID₅₀ de la cepa Winterfield por 1 hora a 37 °C, luego de lo cual se añadió una suspensión de 1,5 x 10⁶ FEP/ml. Se incubaron a 37 °C con 5 % CO₂ durante 4 días. El título se calculó como la inversa de la mayor dilución que no presentó efecto citopático.

3.11.3 ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

A partir de una porción de las bolsas extraídas al sacrificio en condiciones asépticas se aislaron los linfocitos por centrifugación en gradientes de Ficoll Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células aisladas fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales CD3-SPRD, CD4-PE y CD8 α -FITC (Southern Biotech, Birmingham, AL, EEUU), según instrucciones del fabricante. Las suspensiones celulares fueron analizadas con un citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, EEUU) usando el software CellQuest™. El umbral de linfocitos fue definido por la granularidad y tamaño de las células, y se analizaron 30000 eventos.

3.11.5 HISTOPATOLOGÍA

Porciones de BF fueron fijadas en solución de Formol al 10 %, embebidas en parafina y cortadas con un micrótopo. Las mismas fueron teñidas con hematoxilina/eosina siguiendo los protocolos estándares de histología y se observaron al microscopio óptico en busca de lesiones compatibles con la infección por IBDV. Se asignó a cada bursa un score entre 1 y 4 según las lesiones observadas (Silvina Pinto, comunicación personal).

3.11.6 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA

El aislamiento viral posterior a los desafíos con IBDV cepas LZD y Winterfield se realizó a partir de porciones de BF conservadas a -70 °C desde el sacrificio de los animales. Se añadió a cada muestra 1 volumen de PBS estéril y se procedió a disgregarla mecánicamente. Las muestras disgregadas fueron luego sometidas a 3 ciclos de congelado/descongelado. Una vez liberado el virus del tejido, se realizaron diluciones seriadas al décimo de las muestras con las cuales se infectaron células sembradas en placas de 96 pocillos conteniendo 1×10^5 FEP por pocillo. Luego de 4 días a 37 °C con 5 % CO₂ se observaron las placas al microscopio óptico en búsqueda de efecto citopático. El título viral fue calculado por el método de Reed & Muench (1938) y expresado como TCID₅₀ por gramo de tejido.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PREVIOS AL INICIO DE LA TESIS

En el laboratorio se realizó un experimento preliminar para determinar si la VP2 producida en plantas era capaz de generar una respuesta inmune que protegiera a los pollos frente a una infección con IBDV (Gómez et al. 2013). Para ello, se había generado la construcción pBINVP2 a partir del clonado de la región codificante de VP2 madura en el vector binario pBIN, río abajo del promotor de la subunidad pequeña de RUBISCO. Asimismo, se evaluó la expresión transitoria de la proteína en plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con la agrobacteria recombinante para pBINVP2, determinándose el tiempo óptimo de cosecha de las hojas luego de la agroinfiltración. El ensayo en animales demostró que pollos inoculados intramuscularmente (im.) con 3 dosis de extracto de planta concentrado conteniendo 12 µg de VP2 y formulado con adyuvante de Freund (completo en la primera inoculación e incompleto en las siguientes) desarrollaron una respuesta humoral específica contra IBDV con presencia de anticuerpos neutralizantes (Figura 11).

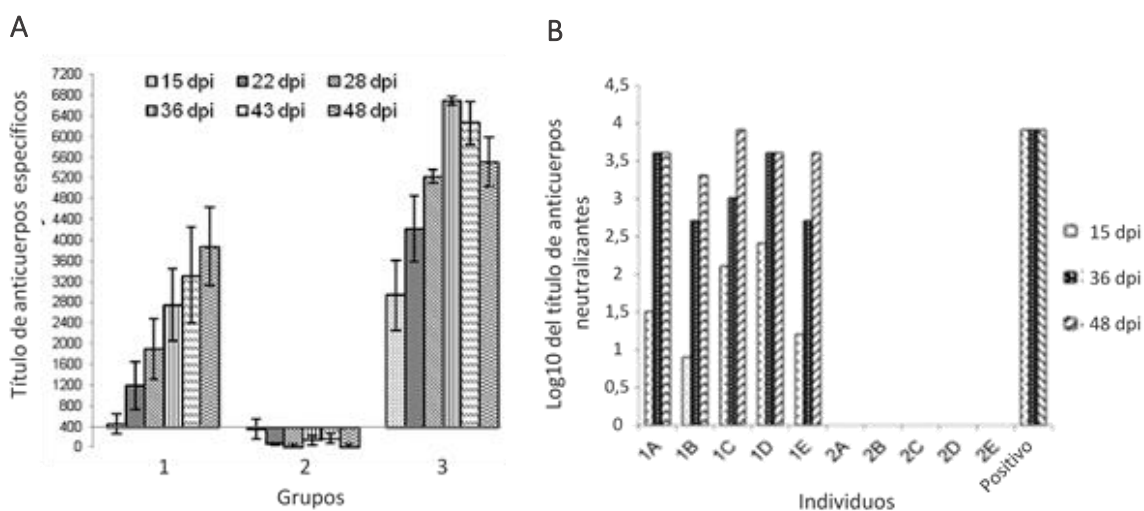


Figura 11: Respuesta humoral anti-IBDV. Los animales fueron vacunados im. a los 0, 22 y 35 días con extracto de planta concentrado conteniendo 12 µg VP2 (Grupo 1), o GFP como antígeno no relacionado (Grupo 2), o vacuna comercial (Grupo 3) y sangrados a los 15, 22, 28, 36, 43 y 48 días post primera inoculación (dpi). **A.** Promedio ± D.E. de los títulos de anticuerpos anti-IBDV de cada grupo a lo largo del tiempo. Títulos mayores al punto de corte (396) fueron considerados positivos. **B.** Títulos individuales de anticuerpos neutralizantes expresados como la inversa de la última dilución que previno la aparición de efecto citopático. Positivo: suero representativo de un animal inoculado con vacuna comercial.

Por otro lado, se observó que la administración de este inmunógeno fue capaz de disminuir la infiltración de linfocitos T en la bursa que normalmente ocurre con la llegada y replicación de IBDV en este órgano luego del desafío (Figura 12A). Además, la bursa de los animales inmunizados con el antígeno recombinante mostraron una morfología normal mientras que los del grupo control negativo tenían una apariencia amarillenta, signo típico de la infección por IBDV (Figura 12B).

Estos resultados sugirieron que la respuesta humoral generada por la VP2 era capaz de neutralizar total o parcialmente la entrada de IBDV a la bursa y nos alentaron a seguir trabajando para mejorar la expresión transitoria de VP2 en plantas, así como las formas de administración del inmunógeno con el fin de avanzar en el desarrollo de una vacuna a subunidad contra IBDV.

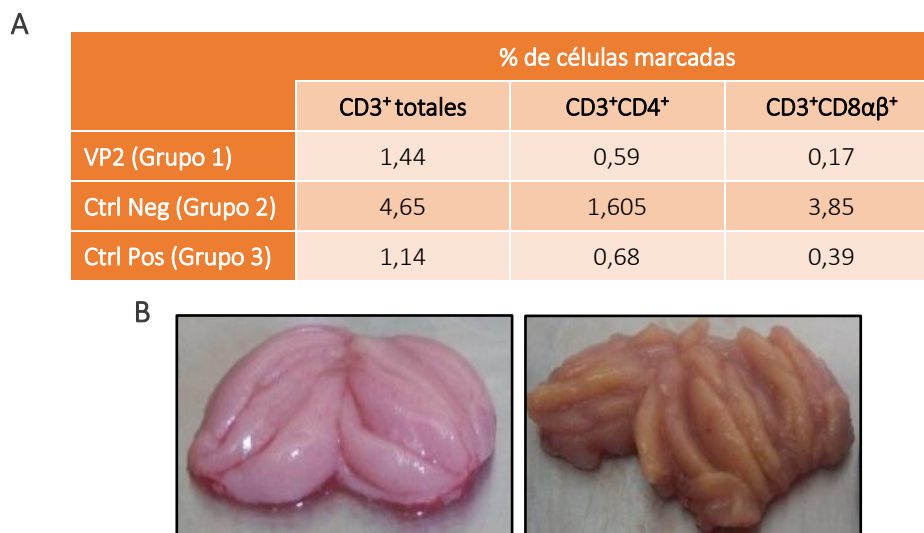


Figura 12: Evaluación del efecto protector del inmunógeno frente al desafío con IBDV. Los pollos fueron desafiados a los 53 dpi (18 días post último refuerzo) con 500 μ l de una cepa clásica de IBDV (6934 TCID₅₀/ml). Luego de 5 días los animales fueron sacrificados y se extrajeron las bursas. **A.** Evaluación de poblaciones celulares en bursa. Las BF fueron agrupadas por grupo experimental y de cada *pool* se aislaron linfocitos que se marcaron con anticuerpos específicos (CD3⁺, CD4⁺ y CD8αβ⁺) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados están expresados como incremento de infiltración dentro de cada grupo con respecto a animales no desafiados. **B.** Observación macroscópica de la bursa. La bursa de los animales vacunados con VP2 (izq) se encontraban sanas mientras que las bursas de los animales del control negativo presentaban una coloración amarillenta típica de la infección por IBDV.

4.2 EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE VP2 PRODUCIDA EN PLANTAS POR DISTINTAS VÍAS

La vía de administración intramuscular de inmunógenos es muy efectiva para desarrollar respuestas humorales sistémicas de tipo IgG; sin embargo, no suele ser eficaz cuando se busca generar una respuesta de mucosas de tipo IgA. Además, es impráctica para vacunaciones masivas y acarrea el riesgo de lastimaduras con las agujas y dolor. La vacunación por la vía de mucosas es menos invasiva, no involucra el uso de agujas y al ser relativamente fácil, no requiere personal especializado.

Por estas razones, y dado que la estimulación simultánea de respuestas IgG sistémica e IgA de mucosas sería deseable en una vacuna contra IBDV, ya que la infección natural ocurre por la vía oral, se decidió investigar si la VP2 producida en plantas también resultaba inmunogénica en pollos cuando era administrada por vía nasal u oral. Además, se evaluó si la vacunación por vía intramuscular en un esquema dirigido a considerar el bienestar animal en su conjunto, con menos dosis y sin adyuvante, era capaz de generar una respuesta inmune protectora contra IBDV como se había observado previamente.

Con estos objetivos en mente se establecieron los siguientes grupos experimentales de 9 pollos cada uno:

1. VP2 im.
2. VP2 nasal
3. VP2 oral
4. Control im.
5. Control nasal
6. Control oral

El material para las vacunaciones de los grupos VP2 y control (ctrl) fue un extracto de proteínas obtenidas de hojas agroinfiltradas con las construcciones pBINVP2 y pBINGFP respectivamente. Este último se utilizó para inmunizar a los grupos que sirven como controles negativos ya que es un antígeno no relacionado a IBDV. Los extractos de planta se analizaron por Western Blot para corroborar la presencia de VP2 utilizando un anticuerpo específico contra esta proteína. Además, se cuantificó el nivel de expresión de VP2 sembrando una muestra del extracto junto con una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA en un gel de poliacrilamida, seguido de una tinción con azul de Coomassie y comparación de las intensidades de las bandas utilizando el

programa gelpro32. Como se puede observar en la Figura 13 se corroboró que VP2 se encontraba en las hojas agroinfiltradas con la construcción pBINVP2, pero no en aquellas agroinfiltradas con pBINGFP, y que la concentración de la misma en el extracto de planta resultó ser $30 \pm 1,09$ ng/ μ l.

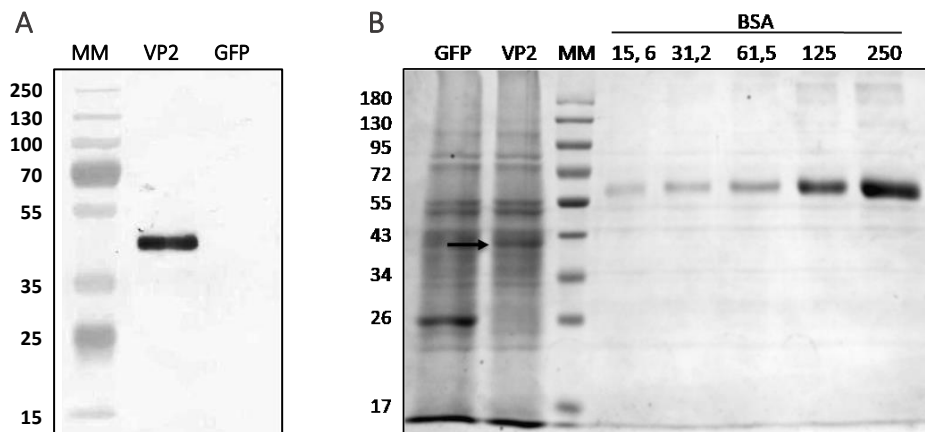
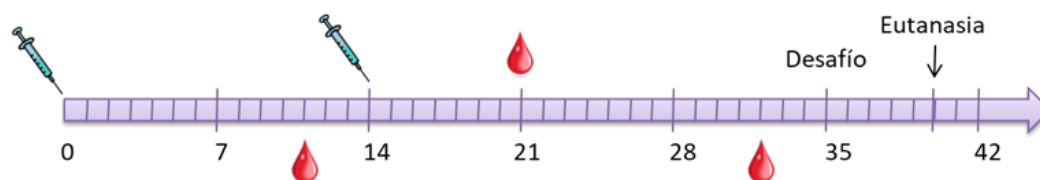


Figura 13: Expresión transitoria de VP2 en *Nicotiana benthamiana*. Las hojas agroinfiltradas con pBINVP2 o pBINGFP fueron procesadas con 3 volúmenes de *buffer* de extracción y las proteínas fueron separadas en un SDS-PAGE 12 %. **A.** Western blot para la identificación de la proteína VP2 recombinante utilizando un suero policlonal anti-VP2. **B.** Cuantificación de la expresión de VP2 en el extracto vegetal por comparación con una curva estándar de BSA (ng/ μ l) en un gel teñido con azul de Coomassie. MM: Marcador de peso molecular.

Con este material se procedió a inocular pollos de 21 días de edad que fueron separados en los 6 grupos mencionados anteriormente. Los primeros 3 grupos recibieron 2 dosis de 250 μ l de extracto de planta conteniendo 7,5 μ g de VP2 por las vías indicadas a los 0 y 14 días post primera inoculación (dpi), mientras que los grupos control (4, 5 y 6) recibieron el mismo volumen de extracto de planta conteniendo GFP. Los animales fueron sangrados por la vena del ala a los 11, 21 y 32 dpi.

De los 9 animales de cada grupo, 6 fueron desafiados por vía oral con 500 μ l de IBDV cepa LZD (6934 TCID₅₀/ml) a los 35 días, mientras que 3 fueron utilizados como controles de animales sanos. Cinco días luego del desafío los pollos fueron sacrificados y las BF se removieron para el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo, histopatología y aislamiento viral. A continuación, se muestra el esquema de sangrías, inoculaciones y eutanasia realizadas durante el ensayo.



4.2.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL

Los plasmas obtenidos de las sangrías exploratorias realizadas en las fechas indicadas fueron analizados utilizando un kit comercial de ELISA para evaluar la presencia de anticuerpos específicos contra IBDV. Títulos superiores a 396 fueron considerados positivos según las instrucciones del fabricante.

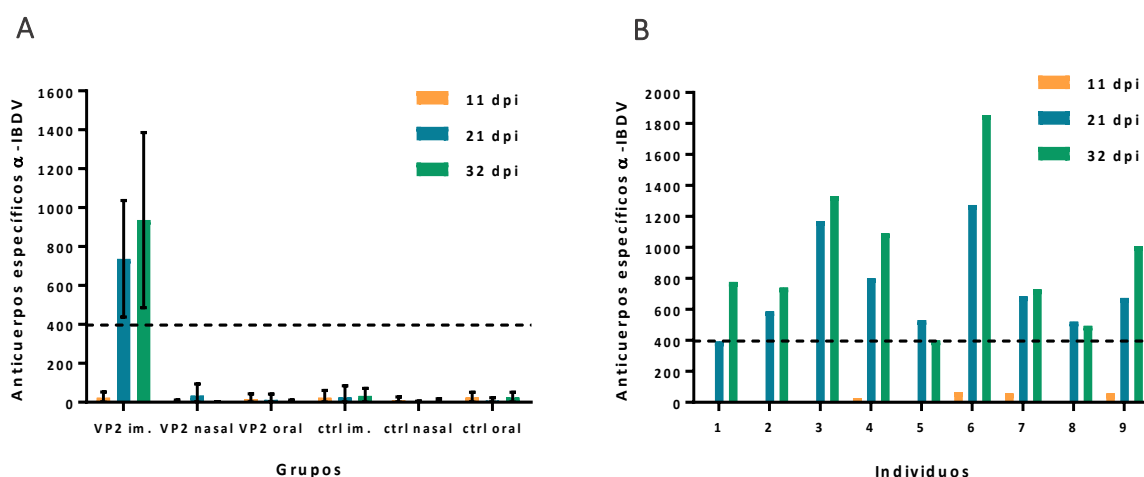


Figura 14: Evaluación de anticuerpos anti-IBDV en plasma por ELISA. Los animales fueron vacunados a los 0 y 14 días con extracto de planta conteniendo VP2, o GFP como antígeno no relacionado (grupos ctrl), por las vías im., nasal u oral. **A.** Promedio \pm D.E. de los títulos de anticuerpos anti-IBDV de cada grupo a lo largo del tiempo. Títulos mayores al punto de corte (396) fueron considerados positivos, según las instrucciones del fabricante. **B.** Títulos individuales de los pollos pertenecientes al grupo VP2 im.

En la Figura 14 se observa que, si bien los niveles de anticuerpos son bastante heterogéneos, todos los animales inoculados im. con el extracto de planta conteniendo VP2 desarrollaron una respuesta humoral específica a los 21 dpi, una semana después del refuerzo, alcanzando los títulos más altos de anticuerpos hacia el final del experimento. Sin embargo, los animales vacunados con el inmunógeno recombinante por vía nasal u oral no presentan anticuerpos contra IBDV luego de dos inoculaciones. Como era de esperar, en los grupos control que recibieron extracto de planta conteniendo GFP no se detectaron anticuerpos específicos.

Además, se evaluó la actividad neutralizante de los anticuerpos anti-IBDV presentes en los animales del grupo VP2 im. a los 32 dpi mediante un ensayo de seroneutralización por dilución límite. Como se observa en la Figura 15, en todos los pollos de este grupo se encontraron anticuerpos con capacidad de neutralizar la infección de IBDV en FEP, y cuyos títulos oscilaron entre 512 y 4096. Los controles de la técnica dieron acorde a lo esperado, el control positivo (P) correspondiente a un suero de un pollo vacunado con una vacuna comercial dio altos títulos de anticuerpos neutralizantes mientras que en el control negativo (N), un suero de un pollo no vacunado, no se detectó la presencia de los mismos. Los sueros de los animales del resto de los grupos no fueron utilizados para realizar este ensayo dado que en ellos no se detectaron anticuerpos específicos contra IBDV.

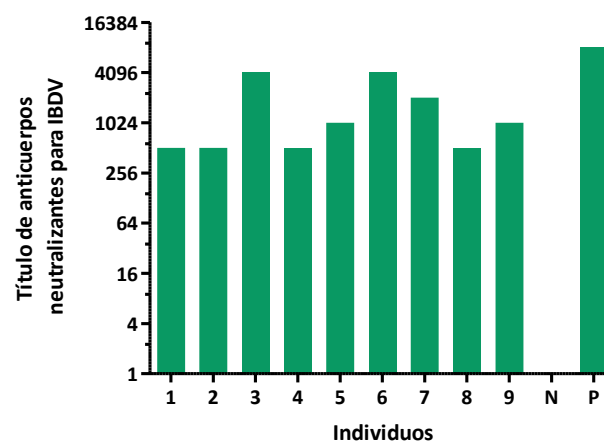


Figura 15: Evaluación de anticuerpos neutralizantes contra IBDV. Los sueros de los animales del grupo VP2 im. obtenidos a los 32 dpi fueron sometidos a un ensayo de seroneutralización. Los títulos están expresados como la inversa de la última dilución que previno la aparición de efecto citopático. Control negativo (N): suero de un animal no vacunado. Control positivo (P): suero de un animal inoculado con vacuna comercial.

Estos resultados indican que dos inoculaciones, sin la adición de adyuvante, de la VP2 producida en plantas es capaz de generar una respuesta humoral efectiva cuando es administrada por vía intramuscular pero no por vía nasal u oral.

4.2.2 EVALUACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN BURSA

Luego de la infección, la replicación de IBDV en la bursa involucra una infiltración de células T en este órgano. Por lo tanto, la frecuencia de linfocitos T en la bursa luego del desafío viral puede ser tomada como un parámetro para medir la eficacia protectora de una vacuna. Se analizó entonces el porcentaje de linfocitos T $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en la bursa de pollos luego de la infección con IBDV. Para esto se tomaron las 6 bursas de los animales desafiados dentro de cada grupo y se procesaron de a pares. Las poblaciones celulares presentes en la bursa fueron analizadas por citometría de flujo utilizando diferentes combinaciones de anticuerpos descriptos en la sección 2.11.4 de Materiales y métodos.

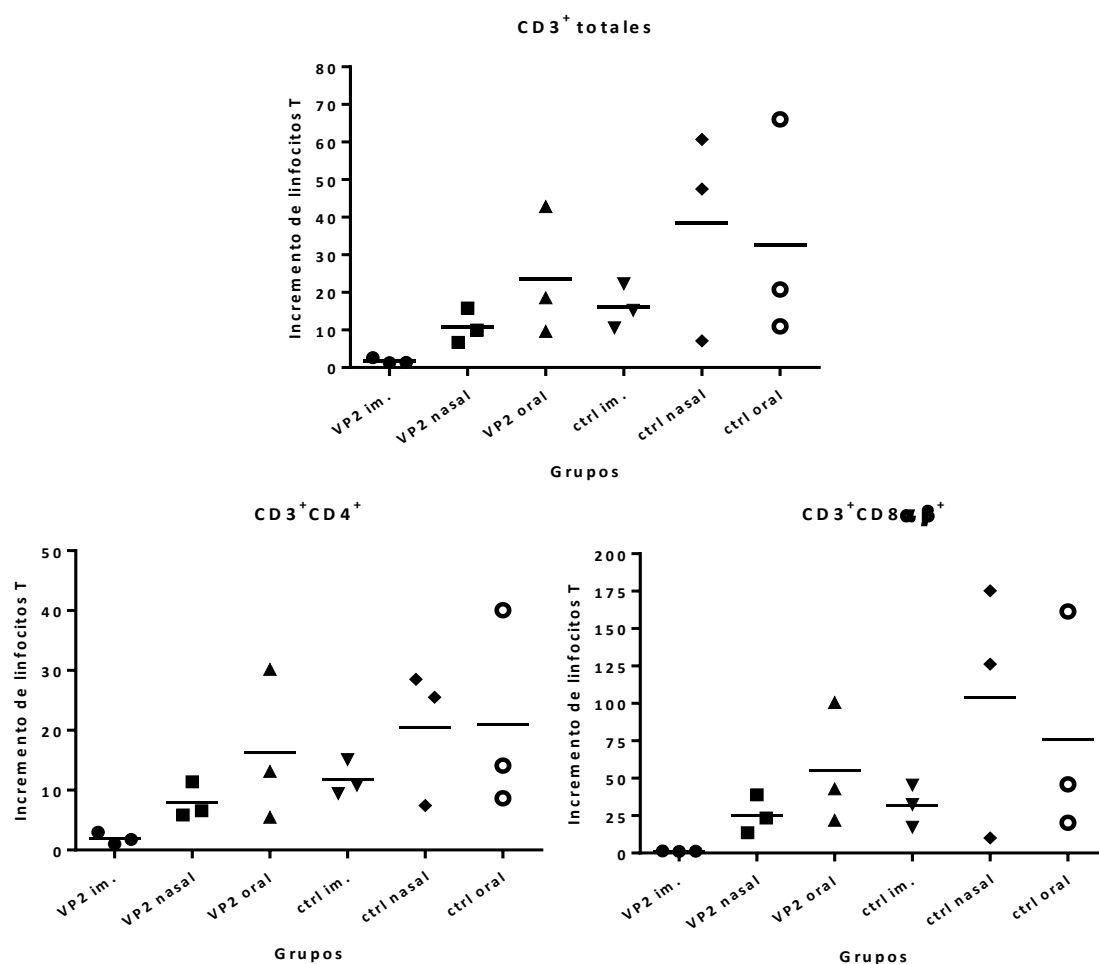


Figura 16: Evaluación de poblaciones celulares en bursa por citometría de flujo. Las bursas de los animales desafiados de los distintos grupos fueron agrupadas de a pares y se aislaron los leucocitos, se marcaron con anticuerpos específicos y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados están expresados como el incremento de cada muestra con respecto a valores de animales no desafiados y el promedio de infiltración dentro de cada grupo.

La Figura 16 muestra el aumento de infiltración de linfocitos T (células CD3⁺) con respecto al valor promedio de animales no desafiados. Tal como ocurre en este caso, es común la obtención de valores de infiltración muy heterogéneos dentro de un mismo grupo, lo cual resulta en diferencias no significativas entre ellos. Sin embargo, se puede observar que los animales del grupo inoculado con VP2 intramuscularmente tienen niveles de infiltración de células T homogéneos y menores (de 1,3 a 2,6 veces de incremento) que los animales vacunados con el mismo inmunógeno por las vías nasal u oral en donde los niveles de incremento variaron entre 6,7 y 42,8 veces. Dentro de los linfocitos T CD3⁺ presentes en la bursa, la mayoría correspondió a células CD8αβ⁺, lo cual es consistente con el hecho de que los linfocitos T citotóxicos juegan un papel importante en la respuesta inmune contra el virus. Tal como se esperaba, la mayoría de los animales inoculados con GFP mostraron un elevado número de linfocitos T en bursa luego de la infección viral.

4.2.3 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DE LA BURSA

La replicación de IBDV en la bursa causa lesiones macroscópicas y microscópicas características en este órgano y el análisis de las mismas constituye una herramienta para la medición de la severidad de la infección en pollos (Singh et al. 2015). Por ello, se realizó un análisis histopatológico en búsqueda de evidencia de la replicación de IBDV en la bursa luego del desafío.

Las bursas de los animales inmunizados intramuscularmente con VP2 no tenían lesiones macroscópicas y su apariencia era similar a la de animales no desafiados. Sin embargo, tanto las bursas de los animales de los grupos VP2 nasal y oral, al igual que la de los grupos control, tenían un color amarillento y presentaban principios de hemorragia, signos típicos de la infección por IBDV. En la Figura 17 se muestran ejemplos de una bursa sana correspondiente al grupo VP2 im. (17A) y bursas del resto de los grupos con distintos grados de afección (17B, C, D y E).

Con respecto a la observación microscópica, las bursas del grupo VP2 im. mostraron características histopatológicas comparables con la de los pollos sin desafiar, aunque algunas de ellas presentaron bajos niveles de linfocitos apoptóticos. Por el contrario, el resto de los animales tenían daños en este órgano con diferentes grados de atrofia linfoide, necrosis y apoptosis. Estas bursas también presentaron edema,

congestión y pequeñas hemorragias junto con infiltración de linfocitos y heterófilos y pérdida del límite entre médula y corteza (Figura 18).

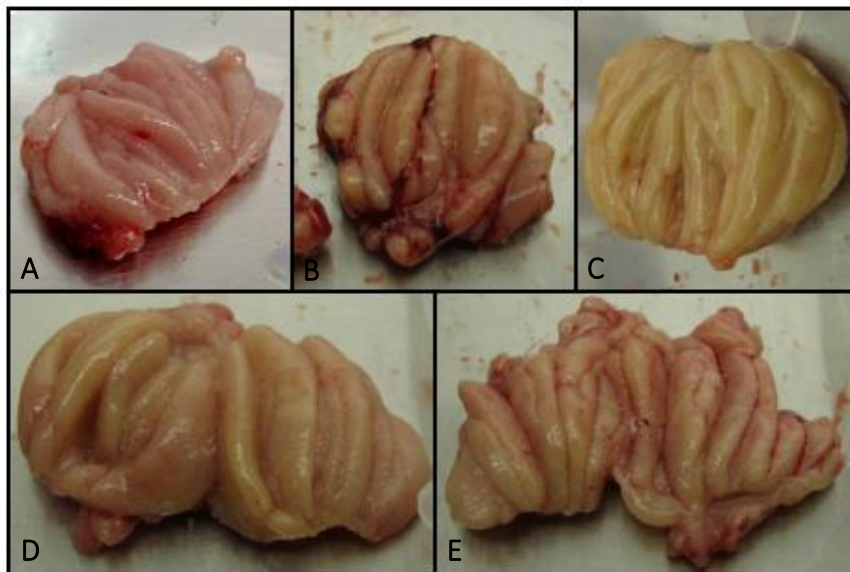


Figura 17: Observación macroscópica de la BF. Los animales fueron sacrificados cinco días después del desafío y sus bursas fueron removidas. **A.** Bursa sana perteneciente al grupo VP2 im. **B, C, D y E.** Bursas representativas de los diversos niveles de afección encontrados en los grupos VP2 nasal, VP2 oral y grupos control. En ellas se observa distinto grado de coloración amarillenta, hemorragia y edema.

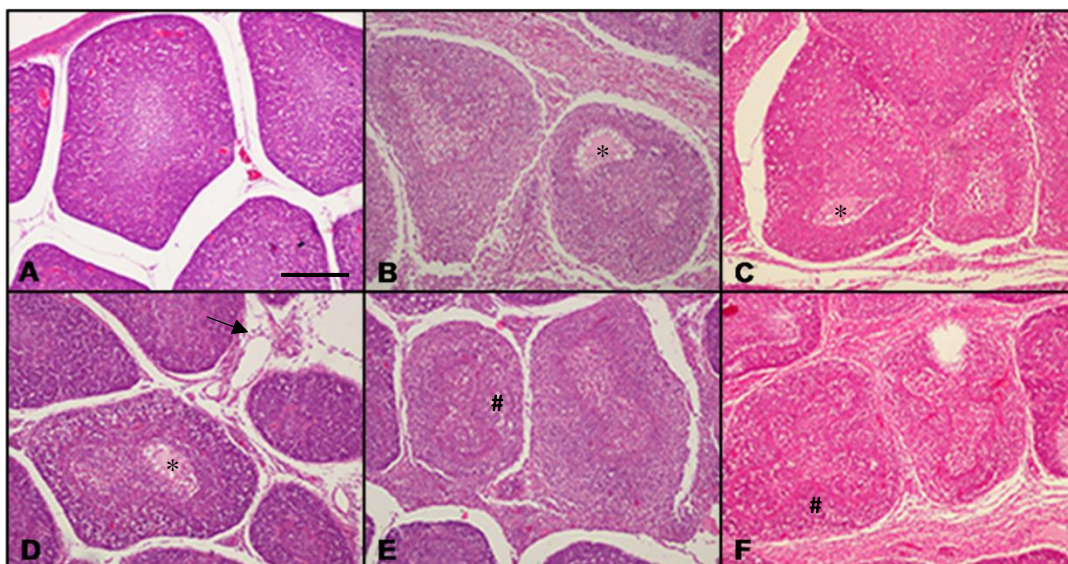


Figura 18: Observación microscópica de la BF. Porciones de bursas de animales del grupo VP2 im. **(A)**, VP2 nasal **(B)**, VP2 oral **(C)**, ctrl im. **(D)**, ctrl nasal **(E)** y ctrl oral **(F)** fueron embebidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina. En la figura se observan distintas lesiones características de IBDV como necrosis (*), edema e infiltración de heterófilos en el intersticio (flecha negra) y pérdida del límite entre médula y corteza (#). La barra negra representa 100 µm.

4.2.4 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA

Finalmente, para evaluar el efecto protector de la vacuna recombinante por las diferentes vías de administración, se realizó un ensayo de aislamiento viral a partir de BF para el recuento de partículas infectivas en este órgano luego del desafío. En la Tabla 3 se muestran los resultados de los títulos virales obtenidos para cada animal. Como era de esperar, no se detectó IBDV en aquellos animales que no fueron desafiados (dato no mostrado) mientras que los pollos de los grupos control tenían altos títulos virales. Los animales pertenecientes al grupo VP2 im. mostraron una notable disminución en la cantidad de virus recuperado de la bursa. En 4 de los 6 animales no se detectó IBDV mientras que los otros 2 mostraron una reducción en el título viral de aproximadamente 10^4 - 10^5 veces con respecto a los grupos control. Es importante aclarar que el límite de detección inferior de la técnica corresponde a un título de $1,26 \times 10^3$ TCID₅₀/g, por lo tanto, un resultado negativo indica un título menor a este valor aunque no podemos precisar el valor exacto. Por otro lado, los pollos inmunizados por vía nasal u oral con VP2 tenían altos títulos virales similares a los de los grupos control. Incluso en varios animales el título excedía el límite de detección superior de la técnica correspondiente a $1,26 \times 10^9$ TCID₅₀/g.

Grupo	Animal	TCID ₅₀ /g	Grupo	Animal	TCID ₅₀ /g
VP2 im.	1	Neg	ctrl im.	1	1,46 x 10 ⁸
	2	Neg		2	> 1,26 x 10 ⁹
	3	Neg		3	> 1,26 x 10 ⁹
	4	1,86 x 10 ⁴		4	> 1,26 x 10 ⁹
	5	Neg		5	4,00 x 10 ⁶
	6	1,26 x 10 ⁴		6	7,10 x 10 ⁸
VP2 nasal	1	4,00 x 10 ⁷	ctrl nasal	1	> 1,26 x 10 ⁹
	2	2,7 x 10 ⁷		2	> 1,26 x 10 ⁹
	3	> 1,26 x 10 ⁹		3	> 1,26 x 10 ⁹
	4	8,6 x 10 ⁸		4	1,26 x 10 ⁸
	5	> 1,26 x 10 ⁹		5	1,86 x 10 ⁸
	6	8,6 x 10 ⁸		6	> 1,26 x 10 ⁹
VP2 oral	1	> 1,26 x 10 ⁹	ctrl oral	1	8,60 x 10 ⁸
	2	1,26 x 10 ⁸		2	4,00 x 10 ⁸
	3	6,80 x 10 ⁸		3	1,26 x 10 ⁷
	4	> 1,26 x 10 ⁹		4	> 1,26 x 10 ⁹
	5	8,60 x 10 ⁸		5	1,86 x 10 ⁸
	6	4,00 x 10 ⁸		6	> 1,26 x 10 ⁹

Tabla 3: Cuantificación de carga viral en bursa luego del desafío. Porciones de bursa de cada animal fueron disgregadas mecánicamente en PBS y sometidas a 3 ciclos de congelado/descongelado. Se realizaron diluciones seriadas al décimo de los homogenatos y se utilizaron para infectar monocapas de fibroblastos de embriones de pollo sembradas en placas de 96 pocillos. Luego de 4 días a 37 °C, se evaluó la presencia de efecto citopático en cada pocillo. El título viral fue calculado por el método de Reed & Muench (1938) y expresado como TCID₅₀ por gramo de tejido. Neg: el resultado negativo corresponde a un título viral menor a 1.26 x 10³ TCID₅₀/g (límite inferior de detección de la técnica).

En conjunto, estos resultados demuestran que la vacunación por la vía de mucosas con el inmunógeno recombinante, al menos en las condiciones estudiadas, no fue capaz de generar una respuesta inmune protectora contra IBDV. Es posible que mayores niveles de VP2 y/o la adición de un adyuvante apropiado sean necesarios para lograr una respuesta inmune, sistémica y de mucosas, efectiva. Por otro lado, dos inoculaciones con el extracto de planta conteniendo 7,5 µg de VP2, y sin adyuvante, fueron suficientes para generar una respuesta inmune con altos títulos de anticuerpos anti-IBDV y actividad neutralizante que fue capaz de prevenir la entrada y/o replicación de IBDV en la bursa evidenciado por el bajo título viral, baja infiltración de linfocitos T y leve o nulo daño en este órgano.

4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VP2 EN PLANTAS

La obtención de altos niveles de proteína en plantas ha sido uno de los principales desafíos de este sistema de expresión. En muchos casos, las pruebas de eficacia de los inmunógenos se han visto afectadas debido a bajos rendimientos, especialmente en el caso de las vacunaciones orales cuyos esquemas requieren de mayor cantidad de proteína que la vacunación parenteral para generar el mismo nivel de respuesta inmune.

En los últimos años se han perfeccionado los vectores para la expresión transitoria de proteínas en plantas con el fin de maximizar los niveles de producción. Entre estos nuevos vectores se encuentra la serie pEAQ desarrollada en el laboratorio del Dr. Lomonossoff (Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich UK) basada en una versión deletada del Cowpea Mosaic Virus (CPMV) con la región 5' y 3' UTR mutada para aumentar los niveles de traducción. Además, estos vectores contienen el gen que codifica para el supresor de silenciamiento p19 con el fin de inhibir el silenciamiento post transcripcional de la planta (Figura 19) (Sainsbury et al. 2009, Peyret y Lomonossoff 2013).

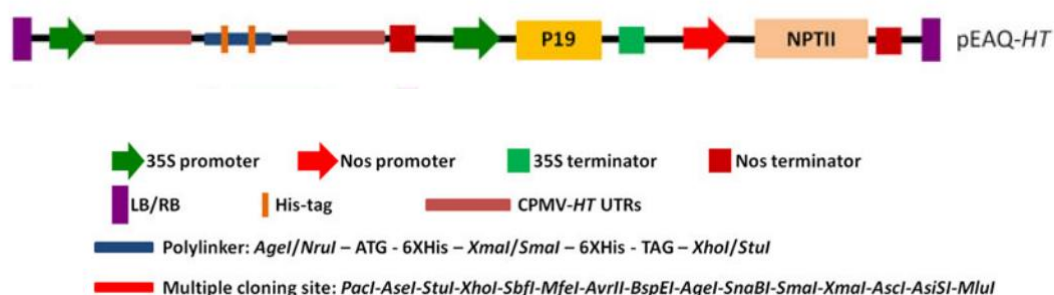


Figura 19: El vector pEAQ. El T-ADN del vector pEAQ-HT utilizado contiene el cassette de expresión CPMVHT, el gen del supresor de silenciamiento p19 y el gen de resistencia a kanamicina NPTII (Peyret y Lomonossoff, 2013).

Con el objetivo de aumentar los niveles de VP2 en nuestro sistema de expresión transitoria en *N. benthamiana*, se amplificó la región codificante de la VP2 madura a partir de pBINVP2 y se clonó entre los sitios AgeI y XhoI de pEAQ-HT de modo que la misma no contuviese ningún tag. Con esta construcción, la cual se denominó pEAQVP2, se electroporaron agrobacterias competentes.

Una vez obtenidas las agrobacterias recombinantes se procedió a comparar los niveles de VP2 alcanzados en plantas a partir de la expresión de pBINVP2 y pEAQVP2.

Para ello se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una suspensión de agrobacterias ($OD_{600}=1$) conteniendo uno u otro plásmido. Se cosecharon hojas a los 4, 5 y 6 días y se extrajeron las proteínas totales utilizando 3 volúmenes de buffer de extracción frío. Parte de las muestras fueron sometidas a un ensayo de Western Blot, con el fin de corroborar la presencia de VP2 utilizando un anticuerpo específico anti-VP2, o fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidas con azul de Coomassie y cuantificadas con el programa gelpro32 para comparar los niveles de expresión de la proteína recombinante.

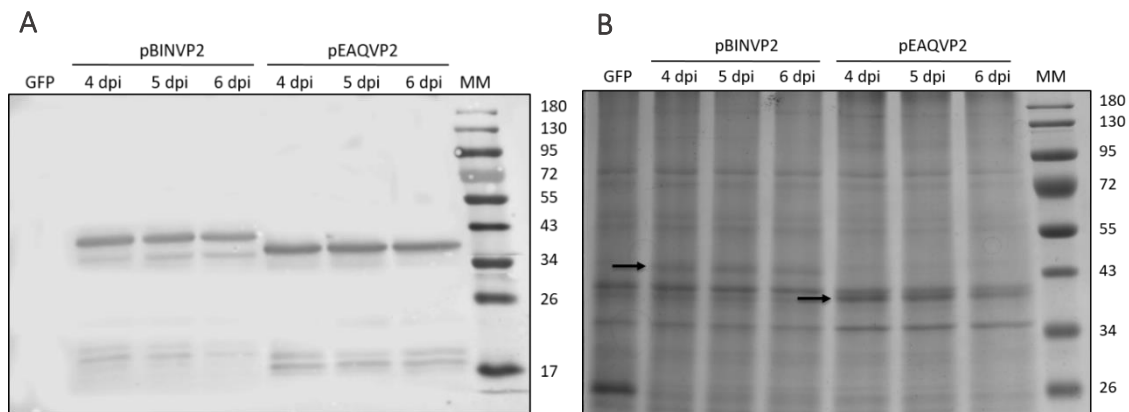


Figura 20: Expresión transitoria de VP2 en *N. benthamiana*. Las hojas agroinfiltradas con pBINVP2 o pEAQVP2 fueron cosechadas a los 4, 5 y 6 días post infiltración (dpi) y procesadas con 3 volúmenes de buffer de extracción. Las proteínas fueron separadas en un SDS-PAGE 12 %. **A.** Western blot para la identificación de la proteína VP2 recombinante utilizando un suero policlonal anti-VP2. **B.** Comparación de la expresión de VP2 en gel teñido con azul de Coomassie. MM: Marcador de peso molecular.

En la Figura 20 se observa que los mayores niveles del antígeno alcanzados con el vector pEAQ fueron al cuarto día post infiltración (dpi) y estos, a su vez, resultaron ser entre el doble y el triple que los obtenidos con el pBINVP2. La diferencia de tamaño de la proteína obtenida por ambos vectores se debe a que en el vector pBINVP2 la proteína se encontraba fusionada a los *tags* de 6xHis y c-myc dando como resultado un producto de aproximadamente 43 kDa, mientras que en pEAQ VP2 fue clonada sin *tags* por lo tanto su tamaño fue menor (40 kDa). Como era de esperar, no se observa la expresión de VP2 en las hojas agroinfiltradas con pEAQGFP (control negativo). Por lo tanto, en todos los experimentos subsiguientes se utilizó la construcción pEAQVP2 y se cosecharon las hojas agroinfiltradas a los 4 dpi para la obtención del inmunógeno.

4.4 OBSERVACIÓN DE PARTÍCULAS SUBVIRALES

Se ha demostrado la formación espontánea de SVP cuando VP2 es expresada en sistemas heterólogos tales como *E. coli*, levaduras y baculovirus/células de insecto, pero hasta el momento no se había reportado la formación de estas estructuras en plantas. Previamente, se había intentado observar la presencia de SVP en el extracto de hojas agroinfiltradas con pBINVP2 sin éxito. Sin embargo, alentados por el hecho de que con el vector pEAQ se alcanzaban altos niveles de VP2 y que la misma había sido clonada sin *tags* que pudieran afectar la formación de partículas subvirales, se decidió estudiar nuevamente si éstas eran capaces de ensamblarse espontáneamente en *N. benthamiana*.

Para esto se aplicó un método simple y rápido de semipurificación adaptado de Peyret (2015) y basado en la ultracentrifugación a través de un doble colchón de sacarosa 25 y 70 % y posterior diálisis. Todos los pasos de la semipurificación y las distintas fracciones fueron analizados por Western Blot y gel teñido con azul de Coomassie para detectar la presencia de VP2. En la Figura 21 se observa tanto en el WB como en la tinción con Coomassie una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente al monómero de VP2 en todas las fracciones de la ultracentrifugación. Las fracciones de la interfase y colchón 70 %, donde se encontraban las proteínas concentradas, se juntaron y se dializaron. Además de limpiar los restos de sacarosa, la diálisis logró eliminar la mayoría de las proteínas contaminantes de la muestra, en especial la rubisco (55 kDa) que se encontraba presente en gran cantidad. Esto no puede explicarse por el tamaño del poro de la membrana utilizada ya que ésta tenía un *cutoff* de 12-14 kDa que impediría el paso de proteínas de mayor tamaño a través de la misma. Sin embargo, es posible que la mayor parte de las proteínas solubles presentes en la muestra se hayan degradado durante el proceso de diálisis mientras que esto no sucedió con VP2 debido a que la misma estaba formando partículas de mayor estabilidad.

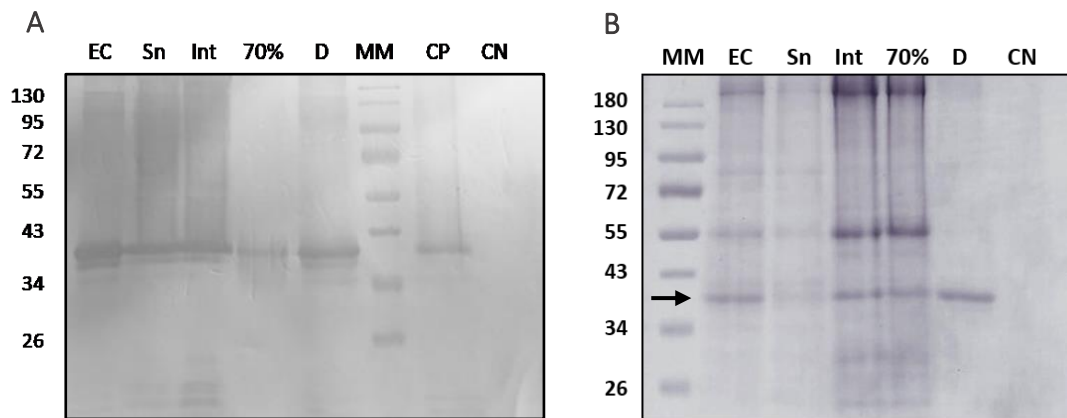


Figura 21: Concentración y semipurificación de partículas subvirales. Las hojas agroinfiltradas con pEAQVP2 fueron procesadas con 3 volúmenes de PBS frío y el extracto crudo (EC) fue sembrado sobre un doble colchón de sacarosa 25 y 70 %. Se tomaron muestras de las distintas fracciones resultantes de la ultracentrifugación (sobrenadante (Sn), la interfase entre la sacarosa 25 y 70 % (Int) y el colchón de sacarosa (70 %)) y de la muestra dializada (D) y se resolvieron en SDS-PAGE 12 % para analizarlas por WB (A) y tinción de Coomasie (B). MM: Marcador de peso molecular; CP: control positivo correspondiente a una muestra de VP2; CN: control negativo correspondiente a un extracto de planta conteniendo GFP que fue sometido al mismo proceso de semipurificación.

La muestra dializada se tiñó con ácido fosfotúngstico 2 % y se observó al microscopio electrónico de transmisión encontrándose partículas esféricas de tamaño homogéneo de aproximadamente 20 nm de diámetro (

FIGURA 22). Algunas de ellas presentan un *core* teñido que indica la ruptura de las mismas. Si bien aún no se ha podido realizar un ensayo de inmunomarcación con oro en el cual se identifiquen las SVP de manera específica con anticuerpos anti-VP2, inferimos que, dado que se obtuvo un alto grado de purificación y se observaron partículas al TEM, dichas partículas están formadas por VP2.

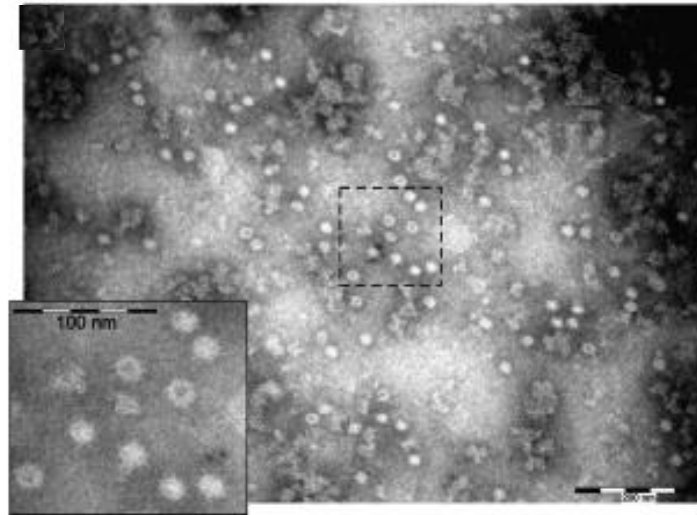


Figura 22: Observación de SVP por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las partículas subvirales fueron semipurificadas a partir de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con pEAQVP2 por un método de ultracentrifugación y posterior diálisis. La muestra fue teñida con ácido fosfotúngstico 2 % y observada al microscopio electrónico CM 200, PHILIPS. La escala de la barra de la figura mayor es de 200nm.

Estos resultados demuestran por primera vez que la VP2 madura expresada en *N. benthamiana* es capaz de ensamblarse espontáneamente formando partículas subvirales.

4.5 EFECTO DEL AUMENTO DE LA DOSIS DEL INMUNÓGENO RECOMBINANTE POR VÍA ORAL

Resultados del laboratorio mostraron que las SVP son muy estables a un amplio rango de temperaturas durante períodos de tiempo prolongados (Cassani 2017). Este hecho sumado a que se ha observado que son muy estables a distintos pH (Taghavian et al. 2012), con lo cual podrían ser más resistentes a la degradación estomacal, nos alentó a ensayar nuevamente la vía oral pero con una concentración mayor del antígeno. Para esto se establecieron los siguientes grupos experimentales de 6 animales cada uno:

1. VP2 im./im.: inoculación con VP2 en un esquema dosis/refuerzo por vía intramuscular.
2. VP2 im./oral: inoculación con VP2 en un esquema dosis/refuerzo por vía intramuscular y luego oral.
3. VP2 oral/oral: inoculación con VP2 en un esquema dosis refuerzo por vía oral.
4. Control: inoculación en un esquema dosis refuerzo im./im (n=2), im./oral (n=2) u oral/oral (n=2) con GFP.

El material para las vacunaciones de los grupos fueron extractos concentrados de hojas agroinfiltradas con la construcción pEAQVP2 o pEAQGFP como control negativo. Para esto se extrajeron las proteínas totales con PBS y se concentraron por ultracentrifugación.

Previo al inicio del experimento se verificó la presencia de VP2 en la muestra por WB y se estimó su concentración en aproximadamente 120 ng/ μ l por comparación con una curva estándar de BSA en un gel de poliacrilamida, seguido de una tinción con azul de Coomassie y cuantificación de las intensidades de las bandas utilizando el programa gelpro32 (Figura 23).

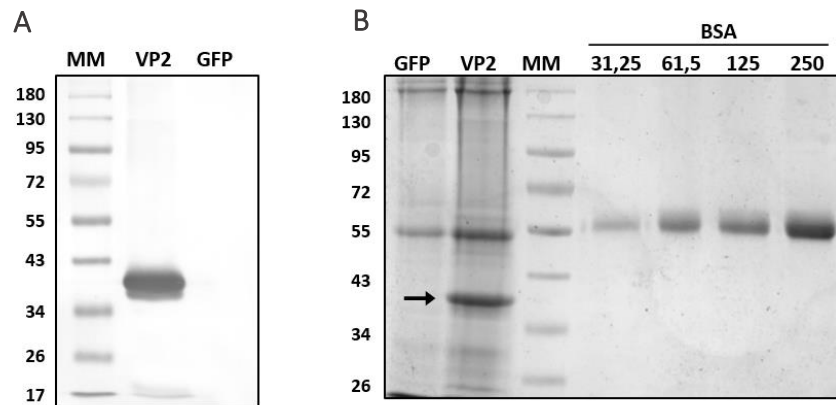
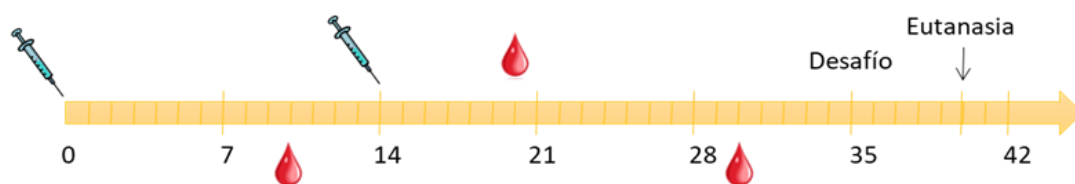


Figura 23: Expresión transitoria de VP2 en *N. benthamiana*. Las hojas agroinfiltradas con pEAQVP2 o pEAQGFP fueron procesadas con 3 volúmenes de PBS, el extracto concentrado por ultracentrifugación y las proteínas separadas en SDS-PAGE 12 %. **A.** Western blot para la identificación de la proteína VP2 recombinante utilizando un suero policlonal anti-VP2. **B.** Cuantificación de la expresión de VP2 en el extracto vegetal por comparación con una curva estándar de BSA (ng/ μ l) en un gel teñido con azul de Coomassie. MM: marcador de peso molecular.

Pollos de 15 días de edad se inocularon por la vía intramuscular con 250 μ l del inmunógeno recombinante concentrado (30 μ g de VP2) o por vía oral con 500 μ l del mismo (60 μ g de VP2) a los 0 y 14 días por las vías indicadas según los grupos. Tres semanas después del refuerzo, los pollos fueron desafiados por vía oral con 500 μ l de IBDV cepa Winterfield ($6,3 \times 10^9$ TCID₅₀/ml). Cinco días luego del desafío se sacrificaron los animales y cada bursa fue removida para el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo, histopatología y aislamiento viral. A continuación, se muestra el esquema de sangrías, inoculaciones y eutanasia realizadas durante el ensayo.



4.5.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL

Los plasmas obtenidos de las sangrías exploratorias realizadas en las fechas indicadas fueron analizados utilizando un kit comercial de ELISA para evaluar la presencia de anticuerpos específicos contra IBDV. Títulos superiores a 396 fueron considerados positivos según las instrucciones del fabricante.

En la Figura 24 se observa que todos los animales que recibieron la primera inoculación por vía intramuscular desarrollaron una respuesta humoral específica luego del refuerzo a los 14 dpi, independientemente de si éste fue por vía oral o intramuscular. Incluso 4 animales resultaron positivos para la presencia de anticuerpos anti-IBDV después de una sola dosis im. Sólo un animal de los seis que fueron inoculados dos veces por vía oral desarrolló una respuesta de anticuerpos específicos contra IBDV. Como era de esperar, en el grupo control no se detectaron anticuerpos específicos contra el virus.

También se realizó un ensayo de seroneutralización con los plasmas obtenidos a los 30 dpi (Figura 25). Los niveles de anticuerpos neutralizantes en el grupo VP2 im./oral resultaron bastante heterogéneos, incluso algunas de las muestras tuvieron títulos más bajos de los esperados (32). Sin embargo, al igual que los títulos observados en el grupo VP2 im./im., que fueron más altos y homogéneos entre sí, éstos resultaron significativamente mayores a los del control negativo en donde no se detectó la presencia de anticuerpos. En el grupo VP2 oral/oral sólo el animal que había resultado positivo para anticuerpos anti-IBDV con el kit de ELISA (Figura 24) tuvo un título alto de anticuerpos neutralizantes (512), mientras que los otros animales mostraron niveles bajos o nulos.

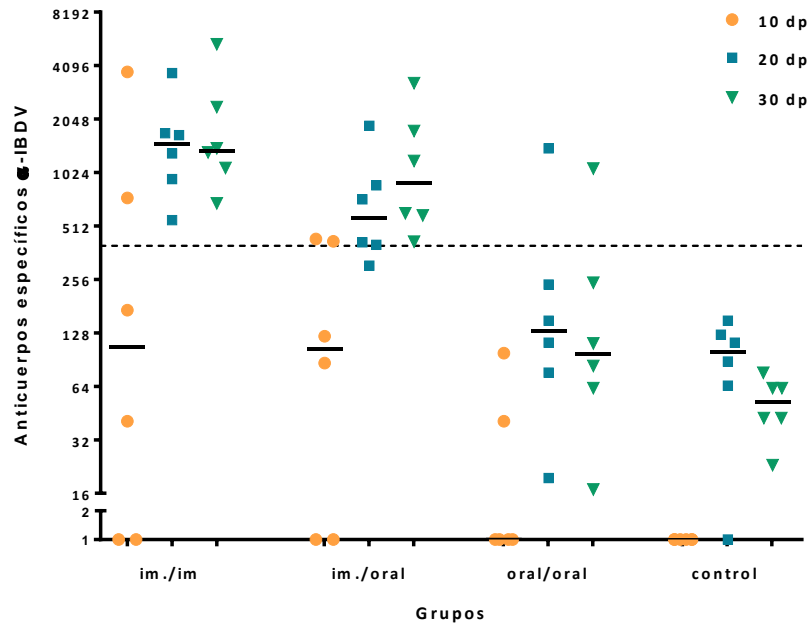


Figura 24: Evaluación de anticuerpos anti-IBDV en plasma por ELISA. Los animales fueron vacunados a los 0 y 14 días con extracto de planta conteniendo VP2, o GFP (grupo control) en esquemas dosis/refuerzo im./im, Im./oral u oral/oral. La figura muestra los títulos individuales de los animales de cada grupo a lo largo del tiempo y el promedio de los mismos (línea negra). Títulos mayores al punto de corte (396) fueron considerados positivos

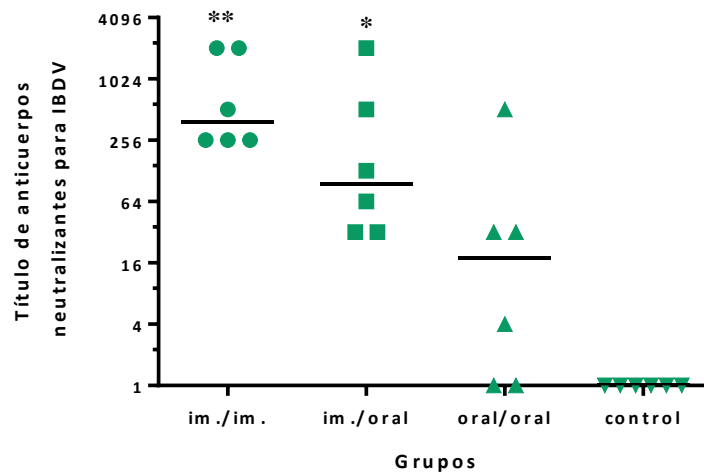


Figura 25: Evaluación de anticuerpos neutralizantes contra IBDV. Los sueros de los animales de los distintos grupos obtenidos a los 30 dpi fueron sometidos a un ensayo de seroneutralización. La figura muestra los títulos individuales de cada grupo, expresados como la inversa de la última dilución que previno la aparición de efecto citopático, y la mediana de los mismos. Los grupos experimentales fueron comparados con el grupo GFP utilizando el test estadístico Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5.2 EVALUACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN BURSA

Nuevamente se analizaron las poblaciones celulares presentes en la bursa luego de la infección con IBDV. En la Figura 26 se observa que luego del desafío viral, los pollos que fueron inoculados con VP2 en un esquema im./im. o im./oral presentaron una infiltración de linfocitos T en bursa significativamente menor (de 0,6 a 2,2 veces de incremento de células $CD3^+CD4^+$ y de 0,4 a 4,4 para los linfocitos $CD3^+CD8ab^+$) con respecto a los animales del grupo control (de 10,8 a 19,9 veces de incremento de $CD3^+CD4^+$ y de 59,3 a 129 para los $CD3^+CD8ab^+$). Sin embargo, aquellas aves que recibieron el inmunógeno por vía oral únicamente presentaron niveles heterogéneos de infiltración. La mitad de estos animales tenían niveles de linfocitos T similares a los otros dos grupos que habían sido inmunizados con VP2, mientras que los otros 3 tenían niveles de infiltración similares al grupo control.

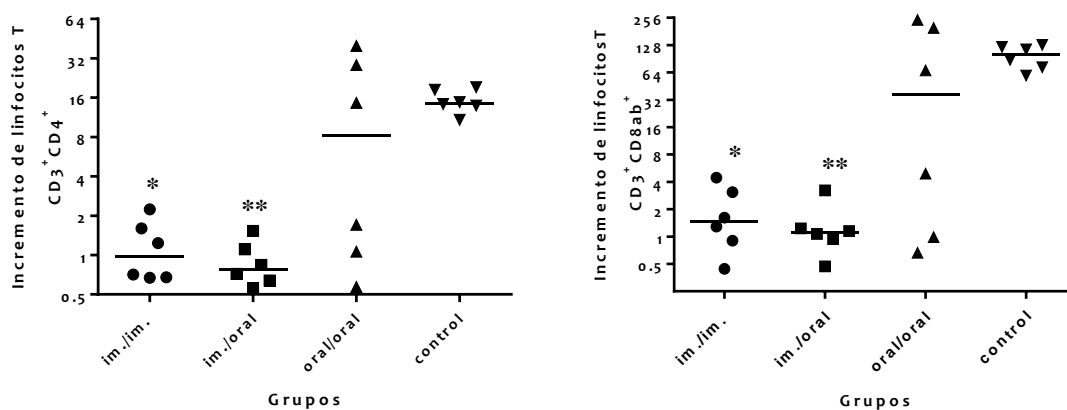


Figura 26: Evaluación de poblaciones celulares en bursa por citometría de flujo. Se aislaron leucocitos de las bolsas de los animales desafiados, se marcaron con anticuerpos específicos y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados están expresados como el incremento de cada muestra con respecto a valores de animales no desafiados y la mediana de infiltración dentro de cada grupo. Los grupos experimentales fueron comparados con el grupo control utilizando el test estadístico Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5.3 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DE LA BURSA

Luego del desafío todos los animales de los grupos VP2 im./im. e im./oral mostraron bolsas sin particularidades macroscópicas (Figura 27B y C respectivamente) similares a las de los pollos no infectados con IBDV (Figura 27A). Si bien algunas bolsas del grupo vacunado oralmente con VP2 se encontraban sanas (Figura 27D), la mayoría presentaban color amarillento y principio de hemorragias (Figura 27E) al igual que las del grupo control (Figura 27F).

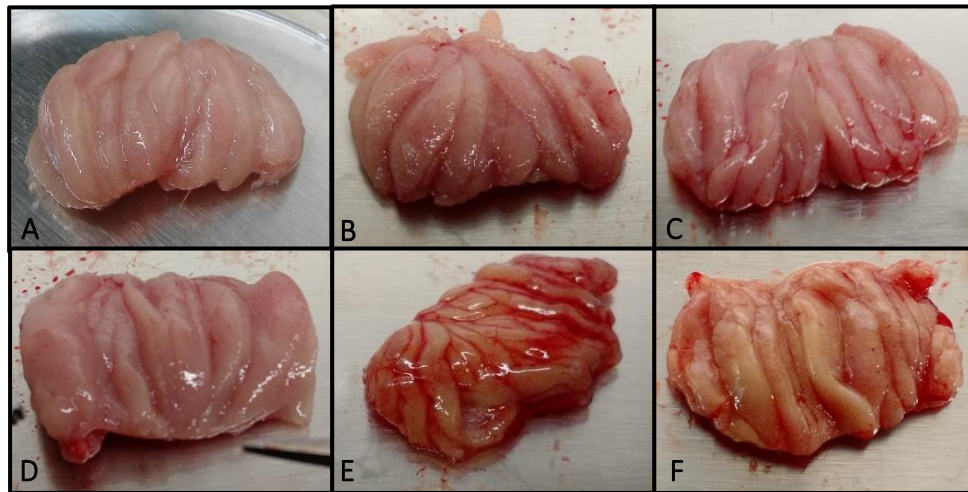


Figura 27: Observación macroscópica de la BF. Los animales fueron sacrificados cinco días después del desafío y sus bursas fueron removidas. La figura muestra bursas representativas de animales sin desafiar (A), de animales del grupo im./im. (B), im./oral (C), una bursa sana y una afectada del grupo oral/oral (D y E respectivamente) y del grupo control (F).

Por otro lado, secciones de bursas fueron teñidas con hematoxilina/eosina y observadas al microscopio. Según las lesiones observadas, se les asignó a las mismas un valor de *score* comprendido entre 1 y 4, en el cual 1 corresponde a bursas sin particularidades y 4 corresponde a las bursas más afectadas. En la Figura 28 se muestran los *scores* obtenidos dentro de cada grupo e imágenes representativas de bursas correspondientes a cada clasificación.

En concordancia con lo que se observó a nivel macroscópico, todas las bursas de los grupos im./im. e im./oral se encontraban sanas (*score* 1) luego del desafío viral. Dentro del grupo oral/oral la mayoría de las bursas se encontraban bastante afectadas, tres de ellas presentaron *score* 3 y una presentó *score* 4; sin embargo, 2 bursas de este grupo tuvieron lesiones leves o nulas. Tal como era de esperar, las bursas del grupo control estaban severamente afectadas, clasificando la mayoría dentro del *score* 4.

A

Grupos	Lesiones histopatológicas de la bursa			
	score 1	score 2	score 3	score 4
im./im.	6	0	0	0
im./oral	6	0	0	0
oral/oral	1	1	3	1
control	0	0	2	4

B

Figura 28: Lesiones histopatológicas de la BF. Porciones de bursas de los animales desafiados fueron embebidas en parafina, teñidas con hematoxilina/eosina y observadas al microscopio óptico. Según las lesiones observadas, se les asignó a las mismas un valor de *score* comprendido entre 1 y 4. *Score 1*: sin particularidades; *Score 2*: disminución de hasta el 30 % de linfocitos con incremento de los repliegues de la mucosa y formación de quistes intraepiteliales; *Score 3*: disminución de entre el 30 y 70 % de linfocitos en la corteza con la mucosa replegada y formación de quistes intrafoliculares; *Score 4*: disminución de más del 70 % de linfocitos en la corteza con necrosis de los folículos o fibrosis. **A.** La tabla muestra el número de animales que clasifica dentro de cada *score* en los distintos grupos. **B.** Fotos representativas de bursas correspondientes a cada *score*. La barra negra representa 200 µm

4.5.4 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN BURSA

En el recuento de partículas virales en la bursa luego del desafío se observó que en 5 de los 6 animales del grupo im./im. y en todos los animales del grupo im./oral no se detectó la presencia de virus. En cambio, en el grupo oral/oral en 4 de las bursas se encontraron títulos virales comprendidos entre 10^4 y 10^6 , similares a los obtenidos en el grupo control. En dos de los animales del grupo oral/oral no se detectó la presencia de IBDV, y coincidentemente, estos eran aquellos que tenían las bursas menos afectadas, con *score* 1 y 2. Además, uno de estos pollos era aquel que había resultado positivo para anticuerpos específicos y neutralizantes para IBDV.

Grupo	Individuo	TCID ₅₀ /g	Grupo	Individuo	TCID ₅₀ /g
Im./im.	1	Neg	oral/oral	1	1,26 x 10 ⁴
	2	Neg		2	1,26 x 10 ⁵
	3	1,26 x 10 ⁴		3	Neg
	4	Neg		4	7,10 x 10 ⁶
	5	Neg		5	1,26 x 10 ⁴
	6	Neg		6	Neg
Im./oral	1	Neg	control	1	4,00 x 10 ³
	2	Neg		2	2,25 x 10 ⁴
	3	Neg		3	1,86 x 10 ⁶
	4	Neg		4	9,34 x 10 ⁴
	5	Neg		5	4,00 x 10 ⁵
	6	Neg		6	1,86 x 10 ⁷

Tabla 4: Cuantificación de carga viral en bursa luego del desafío. Porciones de bursa de cada animal fueron disgregadas mecánicamente en PBS y sometidas a 3 ciclos de congelado/descongelado. Se realizaron diluciones seriadas al décimo de los homogenatos y se utilizaron para infectar monocapas de FEPS sembradas en placas de 96 pocillos. Luego de 4 días a 37 °C, se evaluó la presencia de efecto citopático en cada pocillo. El título viral fue calculado por el método de Reed & Muench (1938) y expresado como TCID₅₀ por gramo de tejido. Neg: el resultado negativo corresponde a un título viral menor a 1.26 x 10³ TCID₅₀/g (límite inferior de la técnica).

Estos resultados demuestran que la administración oral del inmunógeno es efectiva como refuerzo cuando es dado luego de una primera inoculación intramuscular pero no cuando ambas dosis son administradas por esta vía. A pesar de haber aumentado 8 veces la cantidad de antígeno utilizado en la inmunización con respecto al experimento anterior (ver sección 4.1) sólo 2 de 6 pollos del grupo oral/oral resultaron total o parcialmente protegidos frente al desafío. Es posible entonces que sea necesario aumentar aún más la dosis, cambiar el esquema de inmunización y/o adicionar un adyuvante apropiado para obtener una respuesta inmune protectora homogénea.

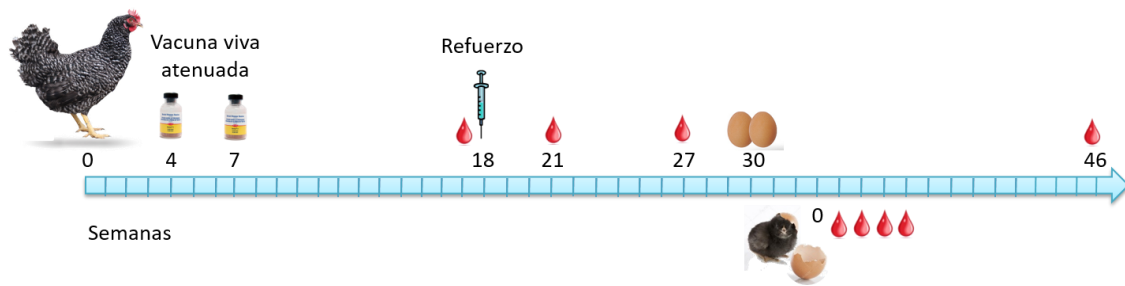
4.6 NUEVO INMUNÓGENO COMO ALTERNATIVA A LA VACUNA INACTIVADA

Los programas de vacunación contra IBDV en las granjas consisten de 1 o 2 dosis de vacunas vivas atenuadas, seguido de una dosis refuerzo de vacuna inactivada en el caso de las gallinas reproductoras. El refuerzo se aplica previo a la postura con el fin de lograr la transmisión de niveles altos y homogéneos de anticuerpos a la descendencia, para su protección durante las primeras semanas de vida. Dadas las desventajas de las vacunas inactivadas ya descritas en la sección 1.3.3.1, se quiso estudiar la eficacia de nuestro inmunógeno como vacuna a subunidad para las gallinas de producción avícola a través del estudio de los títulos y la cinética de los anticuerpos maternos en la descendencia. Con este fin se utilizaron gallinas ponedoras de la raza Plymouth Rock Barrada que habían recibido dos dosis de vacuna viva atenuada contra IBDV según el esquema tradicional de vacunación a las 4 y 7 semanas de edad. A las 18 semanas, y antes del comienzo del período de postura, 60 gallinas fueron separadas al azar en 3 grupos experimentales e inoculadas intramuscularmente como se detalla a continuación:

1. Sin refuerzo: no recibieron refuerzo (control negativo).
2. VP2: 500 μ l del inmunógeno recombinante (30 μ g de VP2) por vía im.
3. Vac. inactivada: una dosis de vacuna inactivada comercial por vía im. (control positivo).

Al igual que en el resto de los experimentos, previamente al inicio del mismo, se verificó la presencia de VP2 en la muestra por WB y se estimó su concentración en aproximadamente 60 μ g/ μ l.

Las gallinas fueron sangradas previamente a la inmunización y a las 3, 9 y 28 semanas post refuerzo (spr) para estudiar si el refuerzo resultó efectivo en aumentar los niveles de anticuerpos específicos de las mismas. A las 12 spr se recolectaron huevos fértiles de las gallinas de cada grupo y se incubaron por separado. Se realizaron sangrías exploratorias durante 4 semanas a parte de la progenie de cada grupo para estudiar la inmunidad pasiva. A continuación, se muestra el esquema de sangrías, inoculaciones y eutanasia realizadas durante el ensayo.



4.6.1 RESPUESTA HUMORAL EN GALLINAS

Los sueros obtenidos de las sangrías exploratorias realizadas en las fechas indicadas fueron analizados con un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio utilizando SVP de IBDV como antígeno adherido a la placa (Cassani 2017). La Figura 29 muestra los resultados obtenidos en cada grupo a lo largo del tiempo. La línea punteada indica el promedio de sueros negativos para la presencia de anticuerpos anti-VP2 más 2 veces el desvío estándar.

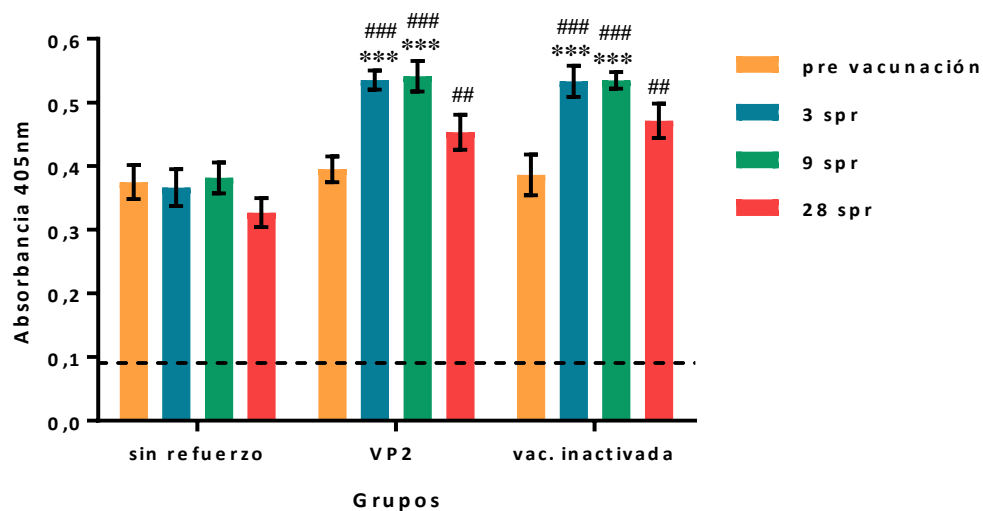


Fig. 29. Evaluación de anticuerpos anti-VP2 por ELISA. Gallinas de producción de 18 semanas fueron vacunadas con el inmunógeno recombinante, con una vacuna inactivada o no recibieron ninguna inoculación. Las mismas fueron sangradas previamente y a las 3, 9 y 28 semanas post refuerzo (spr) y se evaluó la presencia de anticuerpos anti-VP2 en los sueros a través de un ELISA indirecto. Cada columna representa el promedio \pm D.E. de la absorbancia a 405nm de cada grupo a los distintos tiempos evaluados. La línea punteada indica el promedio de sueros negativos para la presencia de anticuerpos anti-IBDV más 2 veces el desvío estándar. Test estadístico: ANOVA 2 factores. *** $p < 0,001$ con respecto a valores prevacunación dentro de cada grupo; ### $p < 0,001$ o ## $p < 0,01$ con respecto a valores del mismo tiempo del grupo sin vacunar.

En las gallinas que recibieron un refuerzo con la vacuna comercial o con VP2 recombinante se produjo un aumento significativo de los niveles de anticuerpos específicos contra VP2 debido a la vacunación. Estos niveles fueron similares en ambos grupos y se mantuvieron constantes durante al menos 9 semanas. A medida que fue transcurriendo el tiempo los niveles de anticuerpos fueron disminuyendo. Por el contrario, los niveles de anticuerpos de aquellas gallinas que no recibieron refuerzo no se modificaron a lo largo del tiempo evaluado, y fueron significativamente menores a los de los otros dos grupos en todos los tiempos post refuerzo evaluados. Estos resultados demuestran que el inmunógeno recombinante es igual de efectivo que la vacuna comercial como refuerzo para aumentar la respuesta humoral de gallinas de postura.

4.6.2 RESPUESTA HUMORAL EN LA PROGENIE

Para la medición de los anticuerpos específicos contra IBDV de los pollitos nacidos de cada grupo de gallinas se utilizó el kit comercial de ELISA que permite obtener títulos de anticuerpos a partir de la absorbancia de manera estandarizada. Se analizaron entre 30 y 40 sueros por grupo a lo largo de las primeras 4 semanas de vida. La Figura 30A muestra el porcentaje de pollitos BB que resultaron positivos para la presencia de anticuerpos anti-IBDV en los tiempos evaluados, mientras que en la Figura 30B se grafica el título individual de anticuerpos de los sueros positivos.

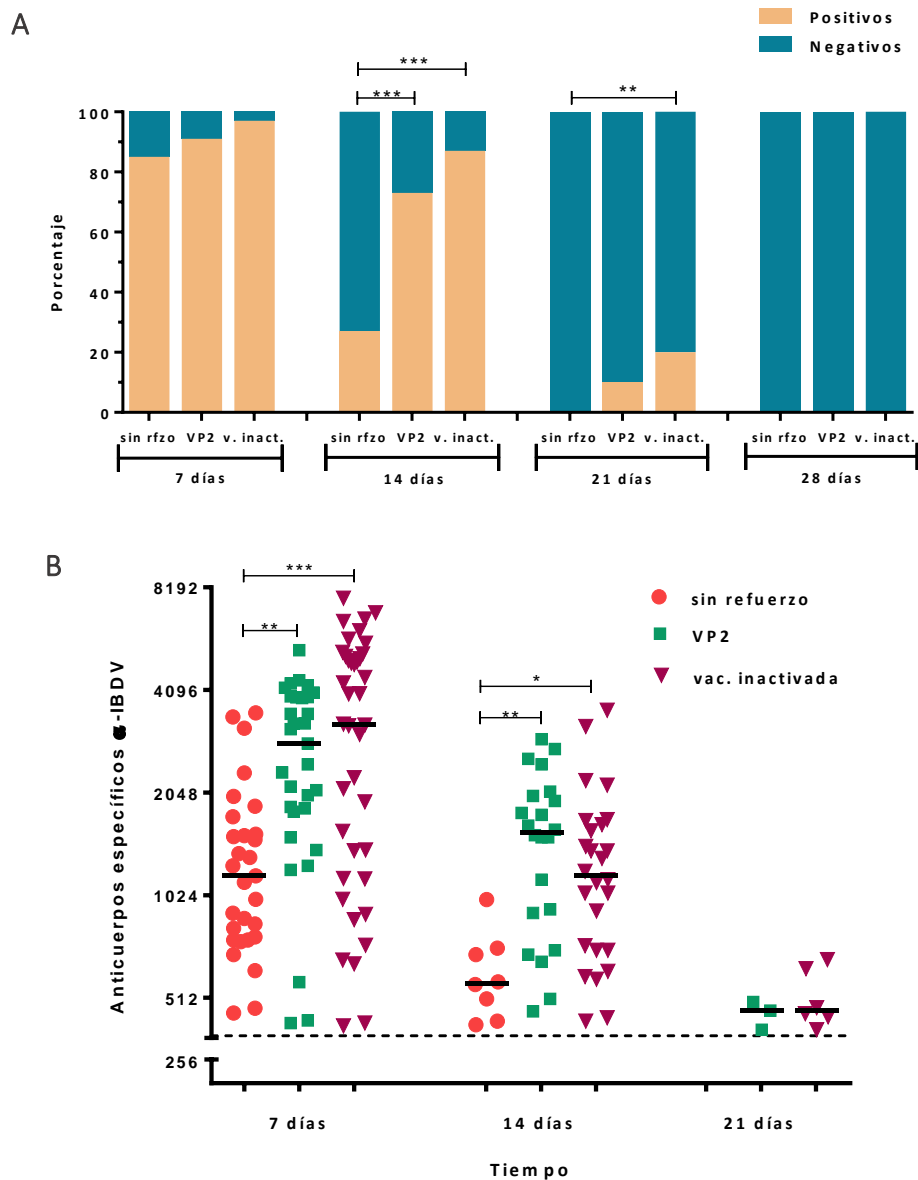


Figura 30: Evaluación de anticuerpos anti-IBDV en plasma por ELISA. Los pollitos BB nacidos de los grupos de gallinas que recibieron un refuerzo con el inmunógeno recombinante (VP2), con una vacuna comercial (V. inact) o que no recibieron ninguna inoculación (Sin rzo.) fueron sangrados semanalmente durante 4 semanas y los sueros fueron analizados con un ELISA comercial. **A.** Porcentaje de pollitos positivos para la presencia de anticuerpos anti-IBDV. Aquellos animales con títulos de anticuerpos > a 396 fueron considerados positivos según las instrucciones del fabricante. A la cuarta semana todos los animales resultaron negativos. Test estadístico Chi-Cuadrado. **B.** Títulos individuales y promedio (línea negra) de anticuerpos de aquellos sueros que resultaron positivos en cada grupo a lo largo del tiempo. Test estadístico: ANOVA de 1 factor. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A los 7 días la mayoría de los pollitos BB nacidos de los tres grupos de gallinas resultaron positivos para la presencia de anticuerpos específicos anti IBDV (el 85, 91 y 97 % para los grupos sin refuerzo, VP2 y vac. inactivada, respectivamente). Sin embargo, al comparar los títulos de anticuerpos, los del grupo sin refuerzo resultaron significativamente menores a los otros dos grupos (Figura 30B). A los 14 días, sólo 8 animales de 30 del grupo sin refuerzo presentaron anticuerpos específicos mientras que 22 pollos del grupo VP2 y 26 del vac. inactivada seguían resultando positivos. Los títulos de estos dos grupos resultaron significativamente mayores que los obtenidos en el grupo sin refuerzo. A los 21 días habían decaído los anticuerpos específicos en la mayoría de los animales y a la cuarta semana todos resultaron negativos. En ninguno de los tiempos evaluados se observaron diferencias significativas en el porcentaje de positividad/negatividad ni en los títulos de anticuerpos entre los grupos VP2 y vac. inactivada.

Estos resultados demuestran que los anticuerpos maternos transferidos a la progenie de las gallinas inoculadas con el inmunógeno recombinante tuvieron títulos y cinética equivalentes a los anticuerpos transmitidos a la descendencia de las gallinas que recibieron la vacuna comercial.

Discusión

5. DISCUSIÓN

El Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa fue identificado por primera vez hace más de 50 años; sin embargo, sigue constituyendo una importante amenaza en la industria avícola a nivel mundial causando significativas pérdidas económicas (Zachar et al. 2016). El control de la enfermedad de Gumboro en las granjas de producción avícola se efectúa a través de dos mecanismos muy importantes, la bioseguridad y la vacunación. La estrategia de vacunación habitual para hacer frente a esta enfermedad se basa en la hiperinmunización de las gallinas reproductoras con vacunas inactivadas, para lograr que los anticuerpos neutralizantes pasen al huevo y protejan a la descendencia durante las primeras semanas de vida; y la posterior vacunación de la progenie, una vez que los niveles de anticuerpos maternos decayeron, con vacunas vivo-atenuadas (Van Den Berg et al. 2000, Chanie y Kegne 2014). Sin embargo, las vacunas tradicionales utilizadas presentan diversas desventajas debido a su naturaleza viral. En consecuencia, la necesidad mundial de producir vacunas que sean seguras y económicas con un mínimo de requerimientos de manufactura y procesamiento, así como el devenir de la biotecnología, han promovido el desarrollo de alternativas eficientes a las vacunas basadas en virus. Entre estas alternativas se encuentra el empleo de plantas como sistema de producción de proteínas de valor terapéutico.

En el presente trabajo se eligió como plataforma para el desarrollo de una vacuna recombinante contra IBD, la expresión transitoria de VP2 en *Nicotiana benthamiana*. Se caracterizó el antígeno y se evaluó la inmunogenicidad y capacidad protectora del mismo tras la inoculación por distintas vías tanto en pollos libres de patógenos específicos como en aves de producción.

5.1 N. BENTHAMIANA COMO PLATAFORMA DE EXPRESIÓN PARA VP2

La utilización de plantas como biofábricas para la producción de proteínas recombinantes de interés humano y veterinario, concepto conocido como *molecular farming*, comenzó hace más de 30 años (Barta et al. 1986). En ese entonces, una de las metas perseguidas era la obtención de vacunas económicas que pudiesen ser administradas a través de la ingestión del material vegetal. Si bien hoy en día se abandonó

en parte el ideal de las vacunas comestibles, las plantas siguen representando un atractivo sistema de expresión de antígenos (Rybicki 2009). Las principales ventajas que ofrecen las plantas como biorreactores son el bajo costo asociado a la generación de biomasa, la capacidad ilimitada de escalado, la ausencia de contaminación con patógenos animales o endotoxinas (Thomas et al. 2011, Hongli et al. 2013, Chen y Davis 2016) y la factibilidad de almacenar la proteína de interés en tejidos donde las mismas sean estables a temperatura ambiente evitando la refrigeración (Streatfield y Howard 2003, Lau y Sun 2009, Boothe et al. 2010). Por otro lado, las desventajas de este sistema de expresión, en comparación con otras plataformas, han estado asociadas al rendimiento de la proteína recombinante y al tiempo de desarrollo de las plantas transgénicas. Se ha estimado que para que las plantas transgénicas puedan competir con otros sistemas de expresión, deben cumplir con un nivel mínimo de producción de la proteína recombinante de alrededor del 1 % con respecto de las proteínas solubles totales (PST) del extracto de la hoja (Rybicki 2009). Otra estimación más reciente del mismo autor sugiere que, por ejemplo, un anticuerpo recombinante producido en plantas debería tener como mínimo un rendimiento de 50 μg por gramo de tejido fresco (TF), para que sea factible su purificación a escala comercial (Rybicki 2010).

En este trabajo de tesis mediante la utilización del vector pEAQ optimizado para la alta expresión transitoria de proteínas recombinantes en plantas, se logró obtener 180 μg de VP2/g de TF. Este valor duplica las cantidades de VP2 que se obtenían en el laboratorio con la construcción pBINVP2 (Lucero et al. 2016). A su vez, estos niveles de VP2 son más altos que los obtenidos en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Wu et al. 2004a), en donde, si bien los autores reportan la obtención de plantas transgénicas en las cuales VP2 representa entre el 0,5 y el 4,8 % de las PST, la masa real de antígeno obtenido en la línea de mayor expresión es de aproximadamente 10 $\mu\text{g/g}$ de TF. Esto no es sorprendente, ya que está ampliamente documentado que los niveles de producción de proteínas heterólogas logrados por expresión transitoria suelen ser mayores que los obtenidos en plantas transgénicas nucleares. De hecho, Taghavian (2013) reportó la obtención de 160 μg de VP2 citoplasmática/g de TF de hojas de tabaco agroinfiltradas, mientras que las líneas transgénicas generadas con la misma construcción tuvieron rendimientos de 10-20 μg de VP2/g de TF. Hasta el momento, los mayores niveles de VP2 alcanzados en plantas fueron en granos de arroz transgénico donde se logró obtener

56,12 µg de VP2 por grano de arroz, lo cual equivale aproximadamente a 2 mg/g de granos (Wu et al. 2007). La utilización de un promotor fuerte específico de semilla (Gt1), junto con la baja actividad de proteasas y contenido de agua en los granos de arroz, pueden explicar los niveles de acumulación tan altos.

Los niveles de expresión de VP2 mencionados siguen siendo menores a los obtenidos generalmente en otros sistemas como bacterias o levaduras donde se han reportado los mayores rendimientos (0,5 g y 1,178 g de VP2/l de cultivo de *P. pastoris* y *E. coli* respectivamente) (Pitcovski et al. 2003, Rong et al. 2007); sin embargo, gracias a la capacidad ilimitada de escalado y al bajo costo asociado al sistema de producción, las plantas tienen la potencialidad de proveer abundante biomasa para acumular niveles suficientes de proteína antigénica, incluso aunque los niveles de expresión no sean muy altos. Por ejemplo, se ha estimado que aproximadamente una hectárea de tabaco sembrado, ya sea a campo o en un invernadero, podría producir alrededor de 10 kg de la proteína de interés considerando una acumulación de 0,1 g de la misma/kg de TF (Kolotilin et al. 2014).

La elección de sistemas de expresión transitoria en lugar de estable no sólo está relacionada a los mayores rendimientos de proteína que se pueden obtener, sino también a que los tiempos de producción y obtención del antígeno son significativamente más cortos. La generación de líneas transgénicas que expresen cantidades adecuadas del inmunógeno de interés es muy laboriosa y puede llevar muchos meses. Es esencial que cualquier sistema de producción de vacunas sea capaz de responder rápidamente frente a un incremento repentino de la demanda (Twyman et al. 2003). Esto es especialmente importante en el caso de las vacunas para IBDV ya que es común la aparición de nuevas cepas virales debido a mutación, recombinación o *reassortment* (Boudaoud et al. 2016, Rautenschlein y Alkie 2016). Una de las dificultades para lograr vacunas vivas atenuadas de alta eficacia para Gumboro está relacionada a la complicación de adaptarlas rápidamente al cultivo celular para cubrir la emergencia de cepas variantes o muy virulentas del virus (Saif 2004, Boudaoud et al. 2016). Alternativamente, se pueden amplificar cepas no adaptadas a cultivo en huevos embrionados o en pollos SPF, a lo cuales se los sacrifica y remueve la bursa posteriormente, pero esto implica un mayor tiempo y complejidad de producción, así como un costo más elevado. En este sentido, las estrategias basadas en la expresión transitoria en plantas que permiten el rápido

reemplazo del gen *vp2* con bajos costos de manufactura, resultan muy apropiados para lidiar con ese escenario.

En los últimos años *Nicotiana benthamiana* se ha convertido en una de las plantas preferidas para la expresión transitoria de proteínas recombinantes debido a que presenta una serie de características favorables como la facilidad de agroinfiltración e infección con componentes virales, rápido crecimiento y una larga historia de uso experimental (Sheludko et al. 2007, Goodin et al. 2008). Además, dado que esta plataforma de expresión se basa en la agroinfiltración de hojas, se reduce significativamente la potencial fuga de genes al medio ambiente a través del polen o la dispersión de semillas (Shah et al. 2013). Por otra parte, *N. benthamiana* es un cultivo no alimenticio, lo cual minimiza el riesgo de que las proteínas recombinantes ingresen a la cadena alimentaria (Twyman et al. 2003). Por todas estas razones, *N. benthamiana* suele ser la planta modelo elegida para la producción de proteínas heteólogas de forma transitoria.

Finalmente, además de las ventajas ya enumeradas, otro beneficio que presentan las plantas como sistema de expresión es la capacidad de producir moléculas complejas que conservan el plegamiento y ensamblado original. La formación de numerosas VLP a partir de la expresión heteróloga de proteínas virales ha sido reportada en este sistema (Santi et al. 2006, Scotti y Rybicki 2013, Marsian y Lomonossoff 2016). En los últimos años las VLP han generado gran interés debido a su potencial aplicación como desarrollos vacunales. Estas son estructuras nanométricas, robustas y simétricas que carecen de genoma. Por lo tanto, mimetizan la estructura del virus nativo siendo muy inmunogénicas pero no replicativas y, consecuentemente, seguras como herramienta vacunal (Spohn y Bachmann 2008). Las VLP han demostrado una fuerte inmunogenicidad debido a la estabilidad y multivalencia del antígeno presentado (Zeltins 2013).

Como se mencionó anteriormente, en el caso de IBDV, se ha observado la formación de VLP o SVP al expresar la poliproteína o VP2 madura en sistemas heterólogos tales como *E. coli* (Chen et al. 2005), levaduras (Taghavian et al. 2013, Wang et al. 2016) y baculovirus/células de insecto (Wang et al. 2000, Martinez-Torrecedrada et al. 2003, Ho et al. 2010, Jackwood 2013, Lee et al. 2015). Muchas de estas estructuras fueron ensayadas como vacunas en pollos y resultaron ser efectivas cuando fueron adyuvadas e inoculadas por vía parenteral, incluso utilizando bajas concentraciones en dosis únicas.

Hasta el momento no ha habido reportes de la formación de partículas de IBDV en plantas. En nuestro laboratorio, realizamos varios intentos de purificación de SVP para poder visualizarlas al microscopio electrónico. Sin embargo, sólo fuimos capaces de observarlas cuando cambiamos el vector de expresión pBINVP2 por el pEAQVP2. Una explicación podría ser que los tags de 6xHis y c-myc fusionados al extremo carboxi-terminal de VP2 expresada a partir de pBIN hayan interferido con el autoensamblado de la misma. También es posible que simplemente la concentración de partículas alcanzada utilizando el vector pBINVP2 haya sido insuficiente para detectar SVP en los campos analizados. El cambio de vector de expresión resultó en mayores niveles de VP2 madura sin tags y permitió la observación de SVP utilizando un protocolo de purificación simple y rápido basado en la ultracentrifugación en doble colchón de sacarosa. Este es el primer reporte exitoso de semipurificación y observación de SVP de IBDV en plantas. Es importante aclarar que si bien proponemos que las SVP se están formando dentro de la planta y no durante el proceso de purificación, deberían realizarse otras técnicas como inmunohistoquímica de tejido vegetal para confirmar la presencia de las SVP *in situ*. Por resultados observados en nuestro laboratorio sabemos que las SVP obtenidas son estables durante al menos un mes a temperatura ambiente y a 37 °C y al menos dos meses a 4°C (Cassani 2017). También observamos que las mismas mantuvieron los epitopes conformacionales del virión debido a que fueron capaces de ser reconocidas por anticuerpos anti-IBDV y, a su vez, despertar una respuesta humoral cuando fueron inoculadas en pollos (manuscrito en preparación).

Dadas las razones previamente enunciadas, creemos que la expresión transitoria en *N. benthamiana* representa una plataforma adecuada y promisoría para la obtención de nuestro antígeno recombinante.

5.2 DESEMPEÑO DEL INMUNÓGENO RECOMBINANTE EN EL HOSPEDADOR NATURAL

Con el fin de evaluar si nuestro antígeno recombinante tenía la potencialidad de ser un buen candidato vacunal para la enfermedad de Gumboro, se realizaron varios ensayos en pollos libres de patógenos específicos en los cuales se estudió la respuesta inmune y la capacidad protectora ante el virus de desafío.

Se realizó un primer experimento en el cual se evaluó si la VP2 producida en plantas administrada por vía intramuscular era capaz de generar una respuesta inmune que protegiera a los pollos frente a una infección con IBDV. Este ensayo exploratorio demostró que la inoculación de 3 dosis del inmunógeno recombinante, conteniendo 12 µg de VP2, formulado con adyuvante de Freund, generó una respuesta humoral específica, con capacidad neutralizante, que logró disminuir la infiltración de linfocitos T en la bursa, hecho que normalmente ocurre con la llegada y replicación de IBDV en este órgano (Gómez et al. 2013). En los ensayos subsiguientes observamos que la protección frente al desafío con IBDV fue lograda incluso con la administración parenteral de sólo dos dosis de 7,5 µg de VP2. Este esquema fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora con altos niveles de anticuerpos específicos y neutralizantes que previno la entrada o replicación de IBDV en la bursa, evidenciado por los bajos títulos virales, la baja infiltración de linfocitos T y ausencia de daño en este órgano. Más aún, en nuestro grupo hemos observado que dosis tan bajas como 0,5 µg del inmunógeno recombinante son capaces de despertar una respuesta humoral específica (Richetta, comunicación personal). Además, no fue necesaria la formulación del inmunógeno con adyuvante para lograr la inmunoprotección contra IBDV. Se ha reportado que extractos de plantas, incluyendo *N. benthamiana*, son capaces de modular la diferenciación de monocitos en células dendríticas y su maduración, aunque la naturaleza química de los compuestos responsables de las propiedades inmunomoduladoras todavía no ha sido determinada (Stein et al. 2002, Bradley et al. 2003, Di Bonito et al. 2009). La ausencia de adyuvantes, que tienden a causar inflamación y ulceración en el sitio de inyección, así como la administración de pocas dosis, son características deseables en una vacuna ya que implican menos estrés al animal y menor costo al productor.

Es importante resaltar la homogeneidad de los resultados obtenidos en todos los animales de los grupos inoculados intramuscularmente con el inmunógeno. En nuestro grupo hemos observado que la respuesta generada en los pollos ante vacunas recombinantes presenta alta variabilidad (Chimeno Zoth, comunicación personal), posiblemente debido a factores intrínsecos de las aves como animales de laboratorio. Las aves que utilizamos en los ensayos no tienen un mismo fondo genético, como sí lo tienen los ratones destinados a experimentación, ya que en el país no contamos con líneas

endocriadas de pollos. Este hecho explica parte de la variabilidad que se observa en los resultados y debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar el experimento.

Varios autores han reportaron la facultad de VP2 recombinante producida en otros sistemas de generar una respuesta inmune capaz de proteger contra IBDV cuando la misma es inoculada por vía parenteral (Pitcovski et al. 2003, Omar et al. 2006, Rong et al. 2007, Su et al. 2011, Pradhan et al. 2012). La mayoría ha ensayado concentraciones altas del antígeno (entre 50 y 800 $\mu\text{g}/\text{dosis}$) con distintos grados de purificación y, generalmente, en presencia de adyuvante. Incluso en estas condiciones, no siempre se obtuvieron porcentajes de protección del 100 % como los que observamos en nuestro laboratorio. Sin embargo, es importante aclarar que en la mayoría de estos ensayos se utilizaron cepas de desafío más virulentas que las que se utilizaron en esta tesis. Debido a que en la Argentina no existen actualmente vvIBDV en circulación no podemos disponer de estas cepas para realizar las infecciones a menos que las mismas sean introducidas al país y contenidas en laboratorios de bioseguridad nivel 3. Dicha limitación, sumada a al hecho de llevar a cabo Buenas Prácticas de Bienestar Animal en nuestras investigaciones, son algunas de las razones por las cuales se pusieron a punto en nuestro laboratorio desafíos con altas dosis de cepas clásicas de IBDV de virulencia intermedia que pueden reproducir la infección minimizando el dolor y estrés del animal (Chimeno Zoth et al. 2017). De todos modos, sería interesante evaluar nuestro inmunógeno frente a cepas clásicas virulentas y linajes circulantes en la Argentina.

Con respecto a la vacunación por la vía de mucosas con VP2 producida en plantas, los resultados no fueron tan alentadores. Ninguno de los animales inmunizados con dos dosis de 7,5 μg del antígeno por vía intranasal u oral fueron capaces de despertar una respuesta inmune efectiva en pollos ya que no se observaron anticuerpos específicos ni estuvieron protegidos frente al desafío con IBDV. Una de las posibles razones por la cual no se obtuvieron resultados satisfactorios podría ser que la cantidad del antígeno no haya sido suficiente. Generalmente, la vacunación por vía de mucosas requiere de mayor cantidad de proteína que la vacunación parenteral para generar el mismo nivel de respuesta inmune (Rose et al. 1999, Gerber et al. 2001, Thanavala et al. 2005). Al repetir el experimento utilizando una mayor concentración del inmunógeno por vía oral (dos dosis de 60 μg) se obtuvieron resultados heterogéneos. Dos animales de seis resultaron parcial o totalmente protegidos contra el desafío y solamente uno de ellos desarrolló una

respuesta humoral. A pesar de que dos dosis orales no fueron suficientes para despertar una respuesta inmune, sí se demostró que esta vía es efectiva cuando es administrada como refuerzo luego de una inmunización intramuscular ya que todos los animales vacunados con este esquema resultaron protegidos luego del desafío, observándose resultados similares a los obtenidos en aquellos animales que recibieron dos dosis del antígeno por vía im.

VP2 ha sido ensayada como inmunógeno por la vía oral en investigaciones previas con resultados variables. Animales inoculados con 5 dosis de extracto crudo de hojas de *A. thaliana* transgénicas que expresaban VP2, si bien presentaron títulos bajos de anticuerpos, mostraron 80 % de protección frente a un desafío con una cepa variante de IBDV medido a través de la relación peso bursa/peso corporal (Wu et al. 2004b). Este resultado es bastante sorprendente debido a que el porcentaje de protección obtenido por esta vía fue mayor al logrado con el mismo esquema de inmunización por vía subcutánea (60 %). Consistentemente con nuestros resultados, estos autores observaron que el mayor nivel de protección fue logrado cuando una dosis oral de extracto crudo fue administrada como refuerzo, aunque en este caso, la primera inmunización fue con una vacuna comercial viva (Wu et al. 2004b). Por otro lado, pollos alimentados con 1, 3 o 5 g de arroz que expresa VP2 a 0, 7, 14 y 21 días montaron una respuesta inmune específica dosis dependiente. Aquellos animales alimentados con 5 g de arroz conteniendo aproximadamente 10 mg de VP2 presentaron los niveles más altos de anticuerpos y de protección (83,3 %) medido como el porcentaje de pollos con bursas con *score*=0 luego del desafío con una cepa muy virulenta de IBDV (Wu et al. 2007). VP2 también fue evaluada por la vía oral a través de la administración de 4 dosis de *Pichia pastoris* que expresaba la proteína viral. Dosis de 400 µg o 4 mg de VP2 indujeron una respuesta inmune protectora contra IBDV que aumentó el porcentaje de supervivencia (entre el 60 y el 100 %) comparado con el grupo control (40 %) luego del desafío, aunque no se observó presencia de anticuerpos específicos en ninguno de los animales vacunados. Los niveles de protección obtenidos no fueron necesariamente dosis dependiente y, en algunos casos, la formulación con un adyuvante oral contribuyó a mejorar los mismos. También se evaluó la capacidad protectora de SVP purificadas a partir de las levaduras recombinantes por la vía oral lográndose niveles de protección del 100% con la

administración de 4 dosis de 500 μ g de partículas, independientemente de la adición de adyuvante (Taghavian et al. 2013).

Estos estudios demuestran que VP2 es resistente a la degradación estomacal basado en el hecho de que fue capaz de invocar una respuesta inmune. Sin embargo, las cantidades de antígeno empleado en estos reportes, excepto en el extracto crudo de *A. thaliana* donde es difícil determinar la concentración utilizada debido a que el manuscrito no lo especifica con claridad, fueron entre 15 y 300 veces más que las evaluadas en nuestros estudios. Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que una mayor masa de nuestro antígeno sea necesaria para poder observar una respuesta inmune homogénea. Otra alternativa para reforzar la respuesta obtenida, es adicionar un adyuvante apropiado para la vía oral para que las dosis de inmunógeno empleadas sean efectivas (Zhang et al. 2007, Lei et al. 2011, Taghavian et al. 2013, Zhai et al. 2014). Actualmente estamos llevando a cabo un ensayo en colaboración con la Dra. Juliana Cassataro en el cual nuestro inmunógeno está siendo coadministrado con la proteína U-Omp 19 de *Brucella*, que ha demostrado tener propiedades adyuvantes por la vía oral (Pasquevich et al. 2010).

La inmunización intranasal u oculonasal en pollos es mayormente utilizada con vacuas vivas atenuadas o vectorizadas (Nayak et al. 2009, Svindland et al. 2012, Zhao et al. 2012); sin embargo, hay algunos pocos estudios en los cuales se utiliza vacunas proteicas a subunidad o vacunas inactivadas administradas por esta vía. La inoculación intranasal de la *outer membrane protein H* (rOmpH) expresada en bacterias fue ensayada como un potencial candidato vacunal para la cólera aviar en pollos (Thanasarakulpong et al. 2015). Una inoculación de 50 μ g de rOmpH adyuvada con enterotoxina B de *E. coli* o con oligodeoxinucleótidos CpG montaron una respuesta de anticuerpos IgY e IgA que confirió 70 y 90 % de protección respectivamente. Otro estudio demostró que la administración nasal del virus de la enfermedad de Newcastle inactivado indujo una respuesta humoral local que protegió a las aves de un desafío letal con una cepa virulenta. La adición de la subunidad B de la toxina colérica a la vacuna inactivada aumentó los títulos de anticuerpos y las tasas de protección (Takada y Kida 1996). Al igual que con la vía oral, creemos que para lograr el estado de protección deseado contra IBDV, son necesarias mayores cantidades del antígeno, aunque esta vía presenta una importante limitación en el volumen que puede ser administrado, y/o la formulación del inmunógeno con un adyuvante adecuado, ya que usualmente se precisa la adición de

inmunomoduladores para generar una respuesta inmune de mucosas robusta (Zaman et al. 2013).

En suma, estos resultados demuestran que el extracto crudo de planta conteniendo VP2 es capaz de generar una sólida respuesta protectora frente a IBDV cuando es inoculado por vía intramuscular; y nos alientan a seguir trabajando en la dosificación y formulación del antígeno para ser administrado por vía de mucosas.

5.3 NUEVO CANDIDATO VACUNAL PARA GALLINAS DE PRODUCCIÓN

Al igual que con las vacunas inactivadas, en general, las vacunas proteicas a subunidad requieren de más de una inoculación para generar una respuesta inmune protectora. Esto es una desventaja en comparación con vacunas replicativas como las atenuadas, las vectorizadas y los complejos inmunes que pueden inducir una fuerte inmunidad en pollos con una sola dosis. Sin embargo, consideramos que puede ser beneficioso el uso de una vacuna a subunidad como refuerzo en animales que fueron primados con una vacuna viva o vectorizada (Richetta et al. 2017). Por esta razón ensayamos la efectividad de nuestro inmunógeno como alternativa a las vacunas inactivadas utilizadas tradicionalmente en las gallinas de producción previo al periodo de postura.

Con este fin se utilizaron gallinas ponedoras de la raza Plymouth Rock Barrada de 18 semanas de edad que habían recibido previamente dos dosis de vacuna viva atenuada contra IBDV según el esquema clásico de vacunación. Nuestro inmunógeno resultó igual de efectivo que la vacuna inactivada en reforzar la respuesta humoral anti VP2 en las gallinas inoculadas aumentando significativamente los niveles de anticuerpos específicos durante al menos 9 semanas. Incluso a las 28 semanas post inoculación, los títulos de anticuerpos de ambos grupos resultaron ser significativamente más altos que los del grupo que no recibieron ningún refuerzo. Estos resultados son consistentes con el obtenido por Fahey y col. (1991) donde gallinas que fueron primadas con vacuna viva e inoculadas 12 semanas después con 45 µg de VP2 producida en levaduras formulado con adyuvante de Freund incompleto, desarrollaron títulos altos de anticuerpos específicos y neutralizantes. Los niveles de anticuerpos alcanzaron su título máximo a las 2 semanas post refuerzo y se mantuvieron elevados al menos 11 semanas. En otro ensayo, gallinas

de 23 semanas, que habían sido inoculadas con vacuna comercial inactivada a las 2 semanas de edad, fueron inmunizadas con 50 µg de VP2 recombinante producida en baculovirus (rVP2) formulado con adyuvante de Freund completo y sangradas a distintos tiempos post refuerzo. Los niveles de anticuerpos específicos fueron similares a los de las gallinas que recibieron una vacuna comercial inactivada como refuerzo en todos los tiempos evaluados, alcanzando su máximo valor a los 10 días post vacunación. Aunque los mismos fueron disminuyendo hacia el día 70, siempre se mantuvieron elevados con respecto a los de aquellas aves que no recibieron refuerzo (Yehuda et al. 2000). Todos estos datos junto con nuestros resultados, demuestran que una dosis de VP2 recombinante (entre 45 y 60 µg) es efectiva para reforzar la respuesta humoral de gallinas previamente vacunadas durante al menos 9-11 semanas, lográndose resultados equivalentes a los obtenidos con las vacunas inactivadas utilizadas habitualmente. Incluso, en el caso de nuestro inmunógeno, no es necesaria la adición de adyuvante para generar esta respuesta.

A su vez, los anticuerpos maternos transferidos a la progenie de los grupos de gallinas inoculadas con el inmunógeno recombinante tuvieron una cinética y títulos similares a los del grupo vacuna comercial, mientras que los anticuerpos maternos transferidos del grupo que no recibió refuerzo tuvieron títulos menores en todos los tiempos evaluados y decayeron más rápido. Incluso, los títulos de anticuerpos de los pollitos del grupo VP2 resultaron ser más homogéneos que los del grupo vacuna inactivada a los 7 días, meta que se persigue con la inmunización de las gallinas previo al periodo de postura (Eidson et al., 1982). A los 14 días post nacimiento más del 70 % de los pollitos proveniente de las gallinas vacunadas con VP2 resultaron positivos para la presencia de anticuerpos específicos, los cuales fueron desapareciendo en su mayoría hacia el día 21. A las 4 semanas de vida ya no se encontraban anticuerpos maternos circulantes en ningún animal. Resultados similares fueron observados por Yehuda y col (2000) donde midieron los niveles de anticuerpos maternos en la progenie de gallinas inoculadas con rVP2 durante 3 semanas. En todos los tiempos evaluados éstos resultaron ser significativamente mayores a los de la descendencia de animales que no recibieron refuerzo, aunque se produjo una reducción significativa de los mismos entre los 10 y 20 días de edad. Estas cinéticas son consistentes con las observadas tanto en nuestro grupo vacuna inactivada como en numerosos reportes donde se describe la progresión de

anticuerpos maternos en la progenie de gallinas de producción (Ahmed y Akhter 2003, Moraes et al. 2005, Gharaibeh y Mahmoud 2013).

Por otro lado, se quiso evaluar si los niveles de anticuerpos de la descendencia de los distintos grupos eran capaces de proteger a los animales frente a un desafío con IBDV. Sin embargo, no pudimos realizar este ensayo de forma adecuada ya que no encontramos una dosis de virus que infectase los pollitos. Si bien utilizamos una cepa de campo virulenta que era capaz de causar daños severos en la bursa de pollos SPF de 2 semanas de edad, la misma no logró infectar a los animales de la raza negra INTA, independientemente de la presencia de anticuerpos maternos. Se ha reportado que existen diferencias en la susceptibilidad de distintas razas de pollos frente a IBDV, siendo la raza White Leghorn, a la cual pertenecen los animales SPF, una de las más afectadas por este virus (Santivatr 1980, Bumstead et al. 1993). Esto resalta la importancia de poner a punto las dosis de infección para cada experimento según la cepa viral utilizada y la raza y edad de los pollos que serán desafiados.

Si bien es necesario volver a repetir el ensayo de desafío en los pollitos BB, los resultados obtenidos hasta el momento respecto a la inmunidad pasiva indicarían la efectividad y posible utilización de nuestro inmunógeno como refuerzo previo a la postura en gallinas de producción.

5.4 FACTIBILIDAD DE LAS VACUNAS BASADAS EN PLANTAS EN EL MERCADO

Desde su aparición hace ya casi tres décadas, el estudio en *molecular farming* ha experimentado una especie de montaña rusa. El desarrollo y refinamiento de las tecnologías para la expresión estable y transitoria en plantas, junto con la aplicación de estos enfoques a una amplia variedad de moléculas producidas en diversas especies modelo y de cultivo, han sido reflejados en una oleada de literatura y patentes (Daniell et al. 2015). Sin embargo, a pesar de estos avances, una combinación de rendimientos no competitivos en plantas transgénicas nucleares, capital limitado para ampliación y desarrollo de productos clínicos, preocupaciones regulatorias sobre la producción de campo y la necesidad de adaptar la tecnología para ajustarse a los rigurosos requisitos de reproducibilidad y estandarización para vacunas y productos terapéuticos, resultó en la reducción o finalización de la mayoría de los esfuerzos comerciales. No obstante, la

investigación básica y aplicada en esta área sigue manteniéndose a flote en laboratorios académicos y en la industria debido a su potencial a largo plazo para combatir enfermedades a un costo reducido en países en desarrollo (Daniell et al. 2015).

En este sentido, la industria veterinaria parecería ser el nicho más apropiado para la explotación de las vacunas basadas en plantas, especialmente en países en vías de desarrollo. La necesidad de mejorar la productividad del ganado y aves de corral, y la preocupación actual por la aparición de resistencia antimicrobiana asociada con la producción animal, exige nuevos productos como vacunas y terapéuticos de bajo costo (Pérez Aguirreburualde et al. 2016). Mientras que muchos grupos han experimentado con la expresión de antígenos de patógenos humanos en las plantas, son los investigadores que trabajan con modelos y patógenos animales quienes han podido llevar a cabo ensayos de inmunogenicidad y desafíos y demostrar las pruebas de eficacia más convincentes para las vacunas producidas en plantas tanto para versiones orales como inyectables (Rybicki 2010, Liew y Hair-Bejo 2015). Por otro lado, el proceso regulatorio para la aprobación de vacunas veterinarias suele ser más sencillo y corto que para aquellas que están destinadas para humanos (Liew y Hair-Bejo 2015). Por estas razones es fácil entender por qué la primera vacuna aprobada y producida en plantas haya sido una vacuna inyectable para aves de corral contra la enfermedad de Newcastle. Esta vacuna fue producida en una línea celular de tabaco en suspensión y registrada y aprobada por el Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) pero nunca fue comercializada. La razón es que aparentemente la compañía, Dow AgroScience, quería “demostrar que su sistema Concert™ Plant-Cell-Produced system era capaz de producir una vacuna segura y efectiva que cumpliera todos los requerimientos para su aprobación bajo los rigurosos estándares del sistema regulatorio de la USDA” (Rybicki 2009). Si bien la licencia de esta primera vacuna hace 10 años tenía como objetivo allanar el campo, desde entonces no ha aparecido otra vacuna veterinaria producida en plantas en el mercado.

La introducción de cualquier innovación tecnológica en una industria conservadora no es una tarea sencilla. La industria de vacunas veterinarias tradicionales no es una excepción, particularmente porque es un mercado más chico que en general tiene un margen de ganancia más estrecho que la industria farmacéutica humana (Knight-Jones et al. 2013). Si bien las enfermedades de los animales de producción

pueden tener costos tanto directos como indirectos, cualquier intervención diseñada para controlar esas enfermedades debe ser rentable. Esto significa que no es suficiente demostrar la inmunogenicidad de una nueva vacuna para probar su viabilidad, sino que también es necesario generar evidencia complementaria de su rentabilidad (Pérez Aguirreburualde et al. 2016).

En nuestro grupo de trabajo creemos que las vacunas veterinarias basadas en plantas tienen el potencial de dar respuesta a los desafíos que la salud animal presenta hoy, cumpliendo con los requerimientos de efectividad y rentabilidad al mismo tiempo y, por lo tanto, vale la pena continuar explorando esta área. Un ejemplo que ilustra este pensamiento es el proyecto AVIAMED para la prevención y control de enfermedades virales aviares para el área Mediterránea con vacunas producidas en plantas. Este proyecto que comenzó en el 2016 tiene una duración de 3 años e involucra a un consorcio formado por institutos de Italia, Egipto y Marruecos. El objetivo general del proyecto es establecer instrumentos innovadores para la prevención y el diagnóstico de la enfermedad de Gumboro y de la enfermedad de Newcastle utilizando plantas como biofábricas. Sería interesante poder plantear un consorcio similar con países de América Latina, especialmente con Brasil donde la avicultura es una actividad productiva sumamente importante, para el desarrollo de vacunas aviares de bajo costo producidas en plantas.

Aún queda un largo camino por recorrer desde la evaluación de nuestro inmunógeno recombinante en el laboratorio hasta la obtención de una vacuna para IBDV producida en planta. Es necesario llevar a cabo más pruebas de seguridad y eficacia, así como definir si es necesario algún grado de purificación y/o formulación del candidato vacunal para que el mismo sea aprobado por los entes regulatorios. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, es fundamental hacer un análisis económico que demuestre la rentabilidad de este candidato vacunal tanto para su producción como para su aceptación en el mercado. No obstante, consideramos que nuestro inmunógeno recombinante es una alternativa atractiva a las vacunas inactivadas y que podría ser de fácil adopción en el campo veterinario.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

A partir de este trabajo de tesis se concluye que:

- ✓ La proteína VP2 se expresa eficientemente en *Nicotiana benthamiana* conservando sus epitopes antígenicos y su capacidad de autoensamblarse formando partículas subvirales.
- ✓ El empleo del extracto de planta conteniendo VP2 como inmunógeno por vía parenteral y sin necesidad de adyuvante, genera una respuesta inmune humoral de altos títulos de anticuerpos específicos y neutralizantes, capaz de proteger a pollos SPF frente al desafío con IBDV.
- ✓ La inoculación del inmunógeno recombinante por la vía de mucosas, en las condiciones estudiadas, no es capaz de generar una respuesta inmune protectora contra IBDV, a menos que sea administrado como refuerzo luego de una primera inmunización intramuscular.
- ✓ El inmunógeno recombinante es efectivo como refuerzo en gallinas reproductoras ya que aumenta los niveles de anticuerpos específicos contra VP2 que son transmitidos a la descendencia con títulos y cinéticas similares a los logrados con una vacuna inactivada comercial.
- ✓ Las plantas de *Nicotiana benthamiana* constituyen una plataforma con gran potencial para la producción de un candidato vacunal que representa una alternativa segura y económica a las vacunas tradicionales para la enfermedad infecciosa de la bursa.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, Z; Akhter, S. 2003. Role of Maternal Antibodies in Protection Against Infectious Bursal Disease in Commercial Broilers. *International Journal of Poultry Science* 2(4):251-255.

Alkhalaf, AN. 2009. Detection of variant strains of infectious bursal disease virus in broiler flocks in Saudi Arabia using antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Pakistan Vet. J* 29(4):161-164.

Barta, A; Sommergruber, K; Thompson, D; Hartmuth, K; Matzke, MA; Matzke, AJM. 1986. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* 6(5):347-357.

Di Bonito, P; Grasso, F; Mangino, G; Massa, S; Illiano, E; Franconi, R; Fanales-Belasio, E; Falchi, M; Affabris, E; Giorgi, C. 2009. Immunomodulatory activity of a plant extract containing human papillomavirus 16-E7 protein in human monocyte-derived dendritic cells. *International journal of immunopathology and pharmacology* 22(4):967-78.

Boot, HJ; ter Huurne, AA; Hoekman, AJ; Peeters, BP; Gielkens, AL. 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *Journal of virology* 74(15):6701-11.

Boothe, J; Nykiforuk, C; Shen, Y; Zaplachinski, S; Szarka, S; Kuhlman, P; Murray, E; Morck, D; Moloney, MM. 2010. Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal* 8(5):588-606.

Böttcher, B; Kiselev, NA; Stel'Mashchuk, VY; Perevozchikova, NA; Borisov, A V; Crowther, RA. 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *Journal of virology* 71(1):325-30.

Boudaoud, A; Mamache, B; Tombari, W; Ghram, A. 2016. Virus mutations and their impact on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 35(3).

Bradley, WG; Widen, RH; Weiser, AM; Powers, JJ; Fountain, LB; Punjwani, P; Lofgren, SM; Hadzic, T; Klein, R; Green, WH; Tanaka, A. 2003. The novel differentiation of human blood mononuclear cells into CD1a-negative dendritic cells is stimulated in the absence of exogenous cytokines by an extract prepared from pinecones. *International immunopharmacology* 3(2):209-23.

Brandt, M; Yao, K; Liu, M; Heckert, RA; Vakharia, VN. 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of virology* 75(24):11974-82.

Brown, MD; Green, P; Skinner, MA. 1994. VP2 sequences of recent European «very virulent» isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *Journal of General Virology* 75:675-680.

Bumstead, N; Reece, RL; Cook, JKA. 1993. Genetic Differences in Susceptibility of Chicken Lines to Infection with Infectious Bursal Disease Virus. *Poultry science* 72(3):403-10.

Carballeda, JM; Maroniche, G; Lucero, MS; Richetta, M; Gómez, E; Chimeno Zoth, S; Berinstein, A. 2015. Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. *Virology* 483:312-317.

Cassani, MF. 2017. Desarrollo de un inmunoensayo basado en nanopartículas recombinantes para la detección de anticuerpos contra la Enfermedad de Gumboro. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Luján.

- Castón, JR; Martínez-Torrecuadrada, JL; Maraver, A; Lombardo, E; Rodríguez, JF; Casal, JI; Carrascosa, JL. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *Journal of virology* 75(22):10815-28.
- Chang, HC; Lin, TL; Wu, CC. 2001. DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* 20(3-4):328-35.
- Chanie, M; Kegne, T. 2014. Review on the Incidence and Pathology of Infectious Bursal Disease. *British Journal of Poultry Sciences* 3(3):68-77.
- Chen, C-S; Suen, S-Y; Lai, S-Y; Chang, GR-L; Lu, T-C; Lee, M-S; Wang, M-Y. 2005. Purification of capsid-like particles of infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 expressed in *E. coli* with a metal-ion affinity membrane system. *Journal of Virological Methods* 130(1-2):51-58.
- Chen, Q; Davis, KR. 2016. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research* 5.
- Chen, Q; Lai, H. 2015. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production. *BioMed research international* 2015:932161.
- Chevalier, C; Lepault, J; Erk, I; Da Costa, B; Delmas, B. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of virology* 76(5):2384-92.
- Chimeno Zoth, S; Carballeda, JM; Gravisaco, MJ; Richetta, M; Gomez, E; Lucero, MS; Berinstein, A. 2017. IBDV Challenge with an Intermediate Strain for Evaluation of Immunogens in Chickens: Seeking for Better Animal Welfare Conditions. *SciFed Virology Research Journal* 1(1).
- Coulibaly, F; Chevalier, C; Gutsche, I; Pous, J; Navaza, J; Bressanelli, S; Delmas, B; Rey, FA. 2005. The Birnavirus Crystal Structure Reveals Structural Relationships among Icosahedral Viruses. *Cell* 120(6):761-772.
- Da Costa, B; Chevalier, C; Henry, C; Huet, J-C; Petit, S; Lepault, J; Boot, H; Delmas, B. 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of virology* 76(5):2393-402.
- Da Costa, B; Delmas, B; Lejal, N; Huet, J-C. 2000. Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *Journal of General Virology* 81(4):983-992.
- Daniell, H; Streatfield, SJ; Rybicki, EP. 2015. Advances in molecular farming: key technologies, scaled up production and lead targets. *Plant Biotechnology Journal* 13(8):1011-1012.
- Degen, WGJ; Daal, N van; Rothwell, L; Kaiser, P; Schijns, VEJC. 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary Microbiology* 105(3-4):163-167.
- Delrue, I; Verzele, D; Madder, A; Nauwynck, HJ. 2012. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Review of Vaccines* 11(6):695-719.
- Dieye, Y; Hoekman, AJW; Clier, F; Juillard, V; Boot, HJ; Piard, J-C. 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Applied and environmental microbiology* 69(12):7281-8.
- Dobos, P; Hill, BJ; Hallett, R; Kells, DT; Becht, H; Teninges, D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of virology* 32(2):593-605.
- Eidson, Cs; Thayer, SG; Villegas P, Kleven SH. 1982 Vaccination of broiler chicks from breeder flocks immunized with a live or inactivated oil emulsion Newcastle disease vaccine. *Poult Sci.* 61(8):1621-9.

- Escaffre, O; Le Nouën, C; Amelot, M; Ambroggio, X; Ogden, KM; Guionie, O; Toquin, D; Müller, H; Islam, MR; Eterradossi, N. 2013. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *Journal of virology* 87(5):2767-80.
- Eterradossi, N; Saif, YM. 2008. Infectious Bursal Disease. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, Mcdougald LR, Nolan LK, Swayne DE. *Diseases of poultry*. 12th ed. Ames: Iowa State University Press; p.185-208.
- Ezeokoli, CD; Ityondo, EA; Nwannenna, AI; Umoh, JU. 1990. Immunosuppression and histopathological changes in the bursa of Fabricius associated with infectious bursal disease vaccination in chicken. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 13(4):181-8.
- Fagard, M; Vaucheret, H. 2000. Transgene silencing In plants: How Many Mechanisms? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51(1):167-194.
- Fahey, KJ; Chapman, AJ; Macreadie, IG; Vaughan, PR; Mckern, NM; Skicko, JI; Ward, CW; Azad, AA. 1991. A recombinant subunit vaccine that protects progeny chickens from infectious bursal disease. *Avian Pathology* 20:447-460.
- Fahey, KJ; Erny, K; Crooks, J. 1989. A Conformational Immunogen on VP-2 of Infectious Bursal Disease Virus that Induces Virus-neutralizing Antibodies that Passively Protect Chickens. *Journal of General Virology* 70(6):1473-1481.
- Fernández-Arias, A; Martínez, S; Rodríguez, JF. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *Journal of virology* 71(10):8014-8.
- Ferrero, D; Garriga, D; Navarro, A; Rodríguez, JF; Verdaguer, N. 2015. Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *Journal of virology* 89(21):11165-8.
- Garriga, D; Querol-Audí, J; Abaitua, F; Saugar, I; Pous, J; Verdaguer, N; Castón, JR; Rodríguez, JF. 2006. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of virology* 80(14):6895-905.
- Gelb, J; Jackwood, DJ; Brannick, EM; Ladman, BS. 2016. Efficacy of Recombinant HVT-IBD Vaccines Administered to Broiler Chicks from a Single Breeder Flock at 30 and 60 Weeks of Age. *Avian diseases* 60(3):603-12.
- Gerber, S; Lane, C; Brown, DM; Lord, E; DiLorenzo, M; Clements, JD; Rybicki, E; Williamson, A-L; Rose, RC. 2001. Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG DNA. *Journal of Virology* 75(10):4752-4760.
- Gharaibeh, S; Mahmoud, K. 2013. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science* 92(9):2333-2336.
- Gleba, Y; Klimyuk, V; Marillonet, S. 2005. Magniflection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23(17-18):2042-2048.
- Gómez, E; Lucero, MS; Chimeno Zoth, S; Carballeda, JM; Gravisaco, MJ; Berinstein, A. 2013. Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against infectious bursal disease virus. *Vaccine* 31(23):2623-7.
- Goodin, MM; Zaitlin, D; Naidu, RA; Lommel, SA. 2008. *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(8):1015-1026.
- Goryo, M; Umemura, T; Itakura, C. 1984. Concurrence of nephrosis-nephritis due to infectious bronchitis virus and infectious bursal disease in broiler chickens. *Avian Pathology* 13(2):191-200.
- Granzow, H; Birghan, C; Mettenleiter, TC; Beyer, JR; Ller, BK; Mundt, E. 1997. A Second Form of Infectious Bursal Disease Virus-Associated Tubule Contains VP4. *Journal of virology* 71(11):8879-8885.

- Haddad, EE; Whitfill, CE; Avakian, AP; Ricks, CA; Andrews, PD; Thoma, JA; Wakenell, PS. 1997. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. (en línea). *Avian diseases* 41(4):882-9.
- Härtle, S; Magor, K; Göbel, T; Davison, F; Kaspers, B. 2014. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: Schat, KA; Kaspers, B; Kaiser, P. *Avian Immunology*. 2nd ed. Elsevier. p.103-120
- Haygreen, EA; Kaiser, P; Burgess, SC; Davison, TF. 2006. In ovo DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV. *Vaccine* 24(23):4951-4961.
- He, C-Q; Ma, L-Y; Wang, D; Li, G-R; Ding, N-Z. 2009. Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology* 384(1):51-8.
- Ho, J-Y; Lee, L-H; Lin, Y-C; Tai, Y-J; Chang, C-K; Chou, Y; Lai, S-Y; Wang, M-Y. 2010. Vaccine development through terminal deletions of an infectious bursal disease virus protein 2 precursor variant. *Process Biochemistry* 45(5):786-793.
- Hongli, L; Xukui, L; Ting, L; Wensheng, L; Lusheng, S; Jin, Z. 2013. Transgenic tobacco expressed HPV16-L1 and LT-B combined immunization induces strong mucosal and systemic immune responses in mice. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9(1):83-9.
- Hsieh, MK; Wu, CC; Lin, TL. 2007. Priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine conferring protection of chickens against infectious bursal disease. *Vaccine* 25(29):5417-5427.
- Hsieh, MK; Wu, CC; Lin, TL. 2010. DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. *Vaccine* 28(23):3936-3943.
- Irigoyen, N; Castón, JR; Rodríguez, JF. 2012. Host Proteolytic Activity Is Necessary for Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 287(29):24473-24482.
- Irigoyen, N; Garriga, D; Navarro, A; Verdaguer, N; Rodríguez, JF; Castón, JR. 2009. Autoproteolytic Activity Derived from the Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein. *Journal of Biological Chemistry* 284(12):8064-8072.
- Ismail, NM; Saif, YM; Moorhead, PD. 1988. Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens. *Avian Diseases* 32(4):757.
- Jackwood, DH; Saif, YM. 1987. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian diseases* 31(4):766-70.
- Jackwood, DJ. 2012. Molecular Epidemiologic Evidence of Homologous Recombination in Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases* 56(3):574-577.
- Jackwood, DJ. 2013. Multivalent Virus-Like-Particle Vaccine Protects Against Classic and Variant Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases* 57(1):41-50.
- Jackwood, DJ; Saif, YM; Moorhead, PD. 1985. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian diseases* 29(4):1184-94.
- Jin, T; Wang, J; Zhu, X; Xu, Y; Zhou, X; Yang, L. 2015. A new transient expression system for large-scale production of recombinant proteins in plants based on air-brushing an *Agrobacterium* suspension. *Biotechnology Reports* 6:36-40.
- Juul-Madsen, HR; Viertlböeck, B; Härtle, S; Smith, AL; Göbel, TW. 2014. Innate Immune Responses. In: Schat, KA; Kaspers, B; Kaiser, P. *Avian Immunology*. 2nd ed. Elsevier. p. 121-147
- Kaiser, P. 2010. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. *Avian Pathology* 39(5):309-324.

- Kelemen, M; Forgách, K; Iván, J; Palya, V; Süveges, T; Tóth, B; Mészáros, J. 2000. Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease. *Acta veterinaria Hungarica* 48(4):443-54.
- Kibenge, FSB; Dhama, V. 1997. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Archives of Virology* 142(6):1227-1236.
- Kibenge, FSB; Dhillon, AS; Russell, RG. 1988. Identification of serotype II infectious bursal disease virus proteins. *Avian Pathology* 17:679-687.
- Knight-Jones, TJD; Edmond, K; Gubbins, S; Paton, DJ. 2013. Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proc. R. Soc. B* 281.
- Kolotilin, I; Topp, E; Cox, E; Devriendt, B; Conrad, U; Joensuu, J; Stöger, E; Warzecha, H; McAllister, T; Potter, A; McLean, MD; Hall, JC; Menassa, R. 2014. Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. *Veterinary research* 45:117.
- Korban, SS. 2005. Opportunities and Challenges for Plant-Based Vaccines. In: Allan Eaglesham. *Agricultural Biotechnology: Beyond Food and Energy to Health and the Environment*. National Agricultural Biotechnology Council p. 71-77.
- Kumar, K; Singh, KC; Prasad, CB. 2000. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical animal health and production* 32(6):357-60.
- Kumar, S; Fladung, M. 2001. Controlling transgene integration in plants. *Trends in plant science* 6(4):155-9.
- Laere, E; Ling, APK; Wong, YP; Koh, RY; Mohd Lila, MA; Hussein, S. 2016. Plant-Based Vaccines: Production and Challenges. *Journal of Botany* 2016:1-11.
- Lau, OS; Sun, SSM. 2009. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production. *Biotechnology Advances* 27(6):1015-1022.
- Lee, H-J; Kim, J-Y; Kye, S-J; Seul, H-J; Jung, S-C; Choi, K-S. 2015. Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. *Virology journal* 12:177.
- Lei, H; Sheng, Z; Ding, Q; Chen, J; Wei, X; Lam, DM-K; Xu, Y. 2011. Evaluation of oral immunization with recombinant avian influenza virus HA1 displayed on the *Lactococcus lactis* surface and combined with the mucosal adjuvant cholera toxin subunit B. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 18(7):1046-51.
- Letzel, T; Coulibaly, F; Rey, FA; Delmas, B; Jagt, E; van Loon, AAMW; Mundt, E. 2007. Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious Bursal Disease Virus. *Journal of Virology* 81(23):12827-12835.
- Li, L; Fang, W; Li, J; Fang, L; Huang, Y; Yu, L. 2006. Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by attenuated *Salmonella* elicits protective immune responses in chickens. *Vaccine* 24(33-34):5919-5927.
- Li, Z; Wang, Y; Li, X; Li, X; Cao, H; Zheng, SJ. 2013. Critical roles of glucocorticoid-induced leucine zipper in infectious bursal disease virus (IBDV)-induced suppression of type I Interferon expression and enhancement of IBDV growth in host cells via interaction with VP4. *Journal of virology* 87(2):1221-31.
- Liew, PS; Hair-Bejo, M. 2015. Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their Applications for Disease Prevention in Animals. *Advances in virology* 2015:936940.
- Lim, BL; Cao, Y; Yu, T; Mo, CW. 1999. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *Journal of virology* 73(4):2854-62.

- Liu, M; Vakharia, VN. 2004. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology* 330(1):62-73.
- Liu, M; Vakharia, VN. 2006. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *Journal of virology* 80(7):3369-77.
- Lombardo, E; Maraver, A; Espinosa, I; Fernández-Arias, A; Rodriguez, JF. 2000. VP5, the Nonstructural Polypeptide of Infectious Bursal Disease Virus, Accumulates within the Host Plasma Membrane and Induces Cell Lysis. *Virology* 277(2):345-357.
- Lucero, MS; Gomez, E; Carballeda, JM; Gravisaco, MJ; Chimeno Zoth, S; Berinstein, A. 2012. Recombinant vaccines and Infectious Bursal Disease Virus. *CAB Reviews* 7(70).
- Lucero, MS; Gomez, E; Richetta, M; Chimeno Zoth, S; Carballeda, JM; Gravisaco, MJ; Delgado, F; Berinstein, A. 2016. Effect of Different Routes of Inoculation on Plant-Derived VP2 Immunogenicity and Ability to Confer Protection Against Infectious Bursal Disease. *J Virol Antivir Res* 5.
- Luque, D; Rivas, G; Alfonso, C; Carrascosa, JL; Rodríguez, JF; Castón, JR. 2009. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(7):2148-52.
- Maas, RA; Venema, S; Oei, HL; Pol, JMA; Claassen, IJTM; ter Huurne, AAHM. 2001. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: Comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus strains of varying virulence. *Avian Pathology* 30(4):345-354.
- Macreadie, IG; Azad, AA. 1993. Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein in bacteria and yeast. *Biochemistry and molecular biology international* 30(6):1169-78.
- Mahgoub, HA. 2012. An overview of infectious bursal disease. *Archives of Virology* 157(11):2047-2057.
- Mahmood, MS; Hussain, I; Siddique, M; Akhtar, M; Ali, S. 2007. DNA vaccination with VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) delivered by transgenic *E. coli* DH5 α given orally confers protective immune responses in chickens. *Vaccine* 25(44):7629-7635.
- Maraver, A; Oña, A; Abaitua, F; González, D; Clemente, R; Ruiz-Díaz, JA; Castón, JR; Pazos, F; Rodriguez, JF. 2003. The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *Journal of virology* 77(11):6438-49.
- Marsian, J; Lomonosoff, GP. 2016. Molecular pharming — VLPs made in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 37:201-206.
- Martinez-Torrecedrada, JL; Castón, JR; Castro, M; Carrascosa, JL; Rodriguez, JF; Casal, JI. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278(2):322-31.
- Martinez-Torrecedrada, JL; Saubi, N; Pagès-Manté, A; Castón, JR; Espuña, E; Casal, JI. 2003. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine* 21(23):3342-3350.
- Mazariegos, LA; Lukert, PD; Brown, J. 1990. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease «intermediate» strains. *Avian diseases* 34(1):203-8.
- Méndez, F; Romero, N; Cubas, LL; Delgui, LR; Rodríguez, D; Rodríguez, JF. 2017. Non-Lytic Egression of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Particles from Infected Cells. *PLOS ONE* 12(1):e0170080.
- Mertens, J; Casado, S; Mata, CP; Hernando-Pérez, M; de Pablo, PJ; Carrascosa, JL; Castón, JR. 2015. A protein with simultaneous capsid scaffolding and dsRNA-binding activities enhances the birnavirus capsid mechanical stability. *Scientific Reports* 5(1):13486..

- Moraes, H; Salle, C; Nascimento, V; Salle, F; Rocha, A; Souza, G; Furian, T; Artencio, J. 2005. Infectious bursal disease: evaluation of maternal immunity and protection by vaccination of one-day old chicks against challenge with a very virulent virus isolate. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 7(1):51-57.
- Müller, H; Islam, MR; Raue, R. 2003. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology* 97(1-2):153-165.
- Müller, H; Mundt, E; Eterradosi, N; Islam, MR. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology* 41(2):133-139.
- Müller, H; Scholtissek, C; Becht, H. 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of virology* 31(3):584-9.
- Müller, R; Käufer, I; Reinacher, M; Weiss, E. 2010. Immunofluorescent Studies of Early Virus Propagation after Oral Infection with Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) . *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 26(5):345-352.
- Mundt, E. 1999. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *Journal of General Virology* 80(8):2067-2076.
- Mundt, E; Köllner, B; Kretzschmar, D. 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of virology* 71(7):5647-51.
- Mundt, E; Zeyda, I; de Haas, N; van Loon, AAWM. 2002. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Journal of General Virology* 83(1):121-129.
- Nayak, B; Rout, SN; Kumar, S; Khalil, MS; Fouda, MM; Ahmed, LE; Earhart, KC; Perez, DR; Collins, PL; Samal, SK. 2009. Immunization of chickens with Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. *PloS one* 4(8):e6509.
- Oláh, I; Nagy, N; Vervelde, L. 2014. Structure of the Avian Lymphoid System. In: Schat, KA; Kaspers, B; Kaiser, P. *Avian Immunology*. 2nd ed. Elsevier. p. 11-44
- Omar, AR; Kim, CL; Bejo, MH; Ideris, A. 2006. Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *Journal of veterinary science* 7(3):241-7.
- Pasquevich, KA; Garcia Samartino, C; Coria, LM; Estein, SM; Zwerdling, A; Ibanez, AE; Barrionuevo, P; Oliveira, FS; Carvalho, NB; Borkowski, J; Oliveira, SC; Warzecha, H; Giambartolomei, GH; Cassataro, J. 2010. The Protein Moiety of *Brucella abortus* Outer Membrane Protein 16 Is a New Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern That Activates Dendritic Cells In Vivo, Induces a Th1 Immune Response, and Is a Promising Self-Adjuvanting Vaccine against Systemic and Oral Acquired Brucellosis. *The Journal of Immunology* 184(9):5200-5212.
- Pendl, H; Tizard, I. 2016. Chapter 11: Immunology. In: Speers, BL. *Current therapy in avian medicine and surgery*. Elsevier. p. 928.
- Pérez Aguirreburualde, MS; Petruccelli, S; Bravo Almonacid, F; Wigdorovitz, A. 2016. Plant-Based Vaccine for Livestock: Key Points to Unleash Platform Translation in Developing Countries. *Current Molecular Biology Reports* 2(4):171-179.
- Perozo, F; Villegas, AP; Fernandez, R; Cruz, J; Pritchard, N. 2009. Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain. *Avian diseases* 53(4):624-8.
- Peyret, H. 2015. A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. *Journal of Virological Methods* 225:59-63.

- Peyret, H; Lomonosoff, GP. 2013. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Molecular Biology* 83(1-2):51-58.
- Pitcovski, J; Gutter, B; Gallili, G; Goldway, M; Perelman, B; Gross, G; Krispel, S; Barbakov, M; Michael, A. 2003. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* 21(32):4736-43.
- Pradhan, SN; Prince, PR; Madhumathi, J; Roy, P; Narayanan, RB; Antony, U. 2012. Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148(3-4):293-301.
- Prandini, F; Simon, B; Jung, A; Pöppel, M; Lemiere, S; Rautenschlein, S. 2016. Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. *Avian Pathology* 45(1):114-125.
- Qin, Y; Zheng, SJ. 2017. Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs. *International journal of molecular sciences* 18(1).
- Rautenschlein, S; Alkie, TN. 2016. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 7:9.
- Rautenschlein, S; Kraemer, C; Montiel, E; Vanmarcke, J; Haase, C. 2007. Bilateral Effects of Vaccination Against Infectious Bursal Disease and Newcastle Disease in Specific-Pathogen-Free Layers and Commercial Broiler Chickens. *Avian Diseases* 51(1):14-20.
- Rautenschlein, S; Kraemer, C; Vanmarcke, J; Montiel, E. 2005. Protective Efficacy of Intermediate and Intermediate Plus Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Vaccines Against Very Virulent IBDV in Commercial Broilers. *Avian Diseases* 49(2):231-237.
- Rautenschlein, S; Yeh, H-Y; Njenga, MK; Sharma, JM. 2002. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* 147:285-304.
- Reed, LJ; Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3):493-497,
- Richetta, M; Gómez, E; Lucero, MS; Chimeno Zoth, S; Gravisaco, MJ; Calamante, G; Berinstein, A. 2017. Comparison of homologous and heterologous prime-boost immunizations combining MVA-vectored and plant-derived VP2 as a strategy against IBDV. *Vaccine* 35(1):142-148.
- Rodenberg, J; Sharma, JM; Belzer, SW; Nordgren, RM; Naqi, S. 1994. Flow Cytometric Analysis of B Cell and T Cell Subpopulations in Specific-Pathogen-Free Chickens Infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases* 38(1):16.
- Rong, J; Jiang, T; Cheng, T; Shen, M; Du, Y; Li, S; Wang, S; Xu, B; Fan, G. 2007. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* 25(46):7900-8.
- Rose, RC; Lane, C; Wilson, S; Suzich, JA; Rybicki, E; Williamson, AL. 1999. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine* 17(17):2129-35.
- Rosenberger, JK; Gelb, J. 1978. Response to Several Avian Respiratory Viruses As Affected by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases* 22(1):95.
- Rybicki, EP. 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug discovery today* 14(1-2):16-24.
- Rybicki, EP. 2010. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant biotechnology journal* 8(5):620-37.

- Saif, YM. 2004. Control of infectious bursal disease virus by vaccination. *Developments in biologicals* 119:143-6.
- Sainsbury, F; Thuenemann, EC; Lomonosoff, GP. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7(7):682-693.
- Santi, L; Huang, Z; Mason, H. 2006. Virus-like particles production in green plants. *Methods* 40(1):66-76.
- Santivatr, D. 1980. Studies on strain susceptibility of chickens to infectious bursal disease virus. PhD dissertation. University of Minnesota. .
- Scotti, N; Rybicki, EP. 2013. Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Review of Vaccines* 12(2):211-224.
- Shah, KH; Almaghrabi, B; Bohlmann, H. 2013. Comparison of Expression Vectors for Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants. *Plant molecular biology reporter* 31(6):1529-1538.
- Sharma, JM; Kim, IJ; Rautenschlein, S; Yeh, HY. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and comparative immunology* 24(2-3):223-35.
- Sheludko, YV; Sindarovska, YR; Gerasymenko, IM; Bannikova, MA; Kuchuk, NV. 2007. Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotechnology and Bioengineering* 96(3):608-614.
- Singh, J; Banga, HS; Brar, RS; Singh, ND; Sodhi, S; Leishangthem, GD. 2015. Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. *Veterinary World*. 8(11):1331-1339.
- Smith, J; Sadeyen, J-R; Butter, C; Kaiser, P; Burt, DW. 2015. Analysis of the Early Immune Response to Infection by Infectious Bursal Disease Virus in Chickens Differing in Their Resistance to the Disease. *Journal of Virology* 89(5):2469-2482.
- Snyder, DB; Vakharia, VN; Savage, PK. 1992. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. (en línea). *Archives of virology* 127(1-4):89-101.
- Spies, U; Müller, H; Becht, H. 1989. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic acids research* 17(19):7982.
- Spohn, G; Bachmann, MF. 2008. Exploiting viral properties for the rational design of modern vaccines. *Expert review of vaccines* 7(1):43-54.
- Stein, GM; Büssing, A; Schietzel, M. 2002. Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 in vitro. *Anticancer research* 22(1A):267-74.
- Streatfield, SJ; Howard, JA. 2003. Plant production systems for vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2(6):763-775.
- Su, BS; Chiu, HH; Lin, CC; Shien, JH; Yin, HS; Lee, LH. 2011. Adjuvant activity of chicken interleukin-12 co-administered with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 139(2-4):167-175.
- Svindland, SC; Jul-Larsen, Å; Pathirana, R; Andersen, S; Madhun, A; Montomoli, E; Jabbal-Gill, I; Cox, RJ. 2012. The mucosal and systemic immune responses elicited by a chitosan-adjuvanted intranasal influenza H5N1 vaccine. *Influenza and other respiratory viruses* 6(2):90-100.
- Tacken, MGJ; Peeters, BPH; Thomas, AAM; Rottier, PJM; Boot, HJ. 2002. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *Journal of virology* 76(22):11301-11.

- Taghavian, O. 2013. Expression and Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Protein for Poultry Vaccine Development and Application in Nanotechnology. PhD dissertation. RWTH Aachen University
- Taghavian, O; Mandal, MK; Steinmetz, NF; Rasche, S; Spiegel, H; Fischer, R; Schillberg, S. 2012. A potential nanobiotechnology platform based on infectious bursal disease subviral particles. *RSC Advances* 2(5):1970.
- Taghavian, O; Spiegel, H; Hauck, R; Hafez, HM; Fischer, R; Schillberg, S. 2013. Protective oral vaccination against infectious bursal disease virus using the major viral antigenic protein VP2 produced in *Pichia pastoris*. *PloS one* 8(12):e83210
- Takada, A; Kida, H. 1996. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. *Veterinary Microbiology* 50(1-2):17-25.
- Thanasarakulpong, A; Poolperm, P; Tankaew, P; Sawada, T; Sthitmatee, N. 2015. Protectivity conferred by immunization with intranasal recombinant outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* serovar in chickens. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 77(3):321-6.
- Thanavala, Y; Mahoney, M; Pal, S; Scott, A; Richter, L; Natarajan, N; Goodwin, P; Arntzen, CJ; Mason, HS. 2005. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(9):3378-3382.
- Thomas, DR; Penney, CA; Majumder, A; Walmsley, AM. 2011. Evolution of plant-made pharmaceuticals. *International journal of molecular sciences* 12(5):3220-36.
- Tizard, I. 2002. The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11(1):2-14.
- Tsukamoto, K; Tanimura, N; Kakita, S; Ota, K; Mase, M; Imai, K; Hihara, H. 1995. Efficacy of Three Live Vaccines against Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus in Chickens with or without Maternal Antibodies *Avian Diseases* 39(2):218.
- Twyman, RM; Stoger, E; Schillberg, S; Christou, P; Fischer, R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21(12):570-578.
- Van de Sandt, CE; Kreijtz, JH; Rimmelzwaan, GF. 2012. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*. Sep;4(9):1438-76.
- Van den Berg, TP. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathology* 29(3):175-194.
- Van den Berg, TP; Eterradossi, N; Toquin, D; Meulemans, G. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 19(2):527-543.
- Valli, A; Busnadiago, I; Maliogka, V; Ferrero, D; Castón, JR; Rodríguez, JF; García, JA. 2012. The VP3 Factor from Viruses of Birnaviridae Family Suppresses RNA Silencing by Binding Both Long and Small RNA Duplexes. *PLoS ONE* 7(9):e45957.
- Von Einem, UI; Gorbalenya, AE; Schirrmeier, H; Behrens, S-E; Letzel, T; Mundt, E. 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 85(8):2221-2229.
- Wang, MY; Kuo, YY; Lee, MS; Doong, SR; Ho, JY; Lee, LH. 2000. Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 67(1):104-111.
- Wang, M; Pan, Q; Lu, Z; Li, K; Gao, H; Qi, X; Gao, Y; Wang, X. 2016. An optimized, highly efficient, self-assembled, subvirus-like particle of infectious bursal disease virus (IBDV). *Vaccine* 34(30):3508-3514.
- Welch, LM. 2015. Th17 immune responses in the chicken. PhD dissertation. The University of Edinburgh.

- Winterfield, RW; Hoerr, FJ; Fadly, AM. 1978. Vaccination against infectious bronchitis and the immunosuppressive effects of infectious bursal disease. *Poultry science* 57(2):386-91.
- Wu, H; Singh, NK; Locy, RD; Scissum-Gunn, K; Giambrone, JJ. 2004a. Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology letters* 26(10):787-92.
- Wu, H; Singh, NK; Locy, RD; Scissum-Gunn, K; Giambrone, JJ. 2004b. Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian diseases* 48(3):663-8.
- Wu, J; Yu, L; Li, L; Hu, J; Zhou, J; Zhou, X. 2007. Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant biotechnology journal* 5(5):570-8.
- Yamaguchi, T; Iwata, K; Kobayashi, M; Ogawa, M; Fukushi, H; Hirai, K. 1996. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. *Archives of virology* 141(8):1493-507.
- Yamaguchi, T; Setiyono, A; Kobayashi, M; Takigami, S; Fukushi, H; Hirai, K. 2000. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian diseases* 44(2):284-90.
- Yao, K; Vakharia, VN. 2001. Induction of Apoptosis in Vitro by the 17-kDa Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus: Possible Role in Viral Pathogenesis. *Virology* 285(1):50-58.
- Yehuda, H; Goldway, M; Gutter, B; Michael, A; Godfried, Y; Shaaltiel, Y; Levi, BZ; Pitcovski, J. 2000. Transfer of antibodies elicited by baculovirus-derived VP2 of a very virulent bursal disease virus strain to progeny of commercial breeder chickens. *Avian Pathology* 29(1):13-19.
- Zachar, T; Popowich, S; Goodhope, B; Knezacek, T; Ojkic, D; Willson, P; Ahmed, KA; Gomis, S. 2016. A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. *Canadian journal of veterinary research* 80(4):255-261.
- Zaman, M; Chandrudu, S; Toth, I. 2013. Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug delivery and translational research* 3(1):100-9.
- Zeltins, A. 2013. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology* 53(1):92-107. D
- Zhai, L; Wang, Y; Yu, J; Hu, S. 2014. Enhanced immune responses of chickens to oral vaccination against infectious bursal disease by ginseng stem-leaf saponins. *Poultry science* 93(10):2473-81.
- Zhang, X; Zhang, X; Yang, Q. 2007. Effect of compound mucosal immune adjuvant on mucosal and systemic immune responses in chicken orally vaccinated with attenuated Newcastle-disease vaccine. *Vaccine* 25(17):3254-62.
- Zhao, K; Chen, G; Shi, X-M; Gao, T-T; Li, W; Zhao, Y; Zhang, F-Q; Wu, J; Cui, X; Wang, Y-F. 2012. Preparation and efficacy of a live newcastle disease virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *PLoS one* 7(12):e53314.