

Tesis Doctoral

Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5

Carballeda, Juan Manuel

2015-03-25

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:

Carballeda, Juan Manuel. (2015-03-25). Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Carballeda, Juan Manuel. "Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-25.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de la relación del virus de la Bursitis
Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta
inmune y de la función y localización de la proteína viral
VP5**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Juan Manuel Carballada

Director de tesis: Dra. Analía Berinstein

Director Asistente: Dra. Silvina Chimeno Zoth

Consejero de Estudios: Dr. H. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, INTA Castelar.

Buenos Aires, 2015

Tesis defendida el 25-3-2015

Resumen

Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5

Las aves representan un eslabón fundamental en la economía internacional. A nivel mundial, alrededor del 40 % de la carne consumida es de origen aviar. La industria avícola ha experimentado en los últimos años un crecimiento muy importante tanto dentro del mercado local como del internacional, permitiendo ubicar a la Argentina en el octavo lugar como exportador mundial de carne de pollo junto con otros productos. El tipo de crianza intensiva utilizada dentro de la producción avícola facilita la aparición de factores que perjudican la estabilidad de los planteles, afectando su status sanitario. Por otra parte, tanto las enfermedades respiratorias como las inmunosupresoras suelen estar íntimamente asociadas con este tipo de crianza.

El virus de la Bursitis Infecciosa Aviar (IBDV) es un patógeno de alta relevancia en la producción avícola debido a que causa, entre otros efectos, inmunosupresión, dejando así a los animales propensos a nuevas infecciones.

El blanco principal del IBDV es la bursa de Fabricio, órgano exclusivo de las aves, donde se desarrollan y maduran los linfocitos B.

En el presente trabajo de tesis doctoral se abordó el estudio de la respuesta inmune inducida por cepas de virulencia intermedia, habitualmente utilizadas como vacunas, en el hospedador natural. Se analizaron distintas facetas como la inducción de la expresión de citoquinas en distintos órganos, la capacidad de proliferación de linfocitos y las poblaciones celulares involucradas. Se estudiaron las vías de inoculación oral e intramuscular, habitualmente utilizadas en la vacunación comercial siendo la oral la vía de entrada natural del virus.

Los resultados mostraron que altas dosis de virus de cepas intermedias son capaces de imitar efectos reportados con cepas de mayor virulencia como son: una fuerte infiltración de linfocitos T en la bursa de Fabricio (analizada por citometría de flujo), junto con una sobreexpresión de interleuquina 6 e interferón gama en este órgano (analizado por RT-PCR en tiempo real) e inmunosupresión (corroborada en ensayos de coinfección con otro agente viral aviar). La segunda

parte del presente trabajo de tesis se abocó al estudio de la proteína no estructural VP5 de IBDV. Su función ha sido ampliamente discutida en la bibliografía respecto a su actividad apoptótica, ya que parece tener efectos opuestos en distintos estadios del ciclo de replicación viral. Por otra parte, también existen reportes ambiguos respecto a su localización subcelular. En el presente trabajo, mediante ensayos *in vitro* y utilizando técnicas de *Imaging*, se determinó la localización de la proteína en la membrana plasmática no exponiendo ningún dominio al espacio extracelular, contradiciendo reportes que indicaban que se trataba de una proteína de transmembrana de clase dos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permitieron desarrollar un método de desafío sin utilizar cepas virulentas de IBDV. Asimismo se caracterizó una amplia variedad de efectos de cepas de virulencia intermedia del virus que, aunque son habitualmente utilizadas como vacuna, no habían sido descritos hasta el presente trabajo de tesis. En la segunda parte, se determinó la localización de la proteína viral VP5. Estos resultados brindan un abanico de posibles mecanismos de acción de la misma, que luego de ser abordados posibilitarán el desarrollo de herramientas y estrategias sanitarias para combatir este importante patógeno aviar.

Palabras clave: Inmunología Aviar, Virus de la Bursitis Infecciosa, citoquinas, apoptosis, localización subcelular de proteínas, proteína viral VP5.

Abstract

Infectious bursal disease virus-host interaction studies: Immune response analysis and function and localization of VP5

Birds play an important role in the international economy. Globally, about 40 % of the meat consumed is of avian origin.

In recent years, the poultry industry has exhibited a significant growth both in the local and international market, being Argentina the eighth largest exporter of chickens along with other avian products. The intensive breeding in poultry production facilitates the emergence of factors that affect the stability of the farms diminishing their health status. Moreover, both respiratory and immunosuppressive diseases are often closely associated with this type of production.

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a highly relevant avian pathogen in poultry production because it causes, among other effects, immunosuppression, leaving the animal susceptible to new infections. The main target of IBDV is the bursa of Fabricius, which is the organ where B-lymphocytes develop and mature.

In the present work, we studied the immune response elicited by IBDV strains of intermediate virulence, commonly used as vaccines, in the natural host. Several parameters, such as the induction of cytokine expression in different organs, the ability of lymphocyte proliferation and the involved cell populations in inoculated chickens were analyzed. The oral and intramuscular routes, usually employed in conventional immunization procedures (the oral route being natural virus entry) were analyzed.

The results showed that high doses of intermediate IBDV strains are able to mimic the effects caused by virulent strains, such as a strong infiltration of T lymphocytes in the bursa of Fabricius (assessed by flow cytometry), together with an overexpression of interleukin 6 and interferon gamma in this organ (analyzed by real time RT-PCR) and immunosuppression (demonstrated by coinfection assays with another avian viral pathogen).

The second part of this thesis focuses on the study of VP5, a non-structural protein of IBDV. Its role has been widely discussed in the literature regarding its apoptotic or anti-apoptotic function because it could have opposite effects at different stages of the viral replication cycle.

Additionally, there are ambiguous reports concerning VP5 subcellular localization. By *in vitro* assays using Imaging techniques, we determined the localization of the protein in the plasma membrane of avian cells. Results showed that VP5 did not expose any domain to the extracellular space even though previous reports had indicated that it was a class two transmembrane protein.

The results obtained in this thesis allowed the development of a method for viral challenge without using virulent strains of IBDV. Also, the characterization of a wide variety of effects induced by intermediate IBDV strains, which had not been described so far, although these strains are commonly used as a vaccine, were described.

In the second part, the localization of VP5 viral protein was determined. Taken together, the results obtained in the present work provide a broad range of possible mechanisms of action for this protein that will contribute to the development of new sanitary tools and strategies to fight against this important avian pathogen.

Key words: Avian immunology, Infectious Bursal Disease Virus, Cytokines, Apoptosis, Subcellular protein localization, Viral protein VP5.

El presente trabajo, así como tantos otros, fue posible gracias a políticas de estado de la última década que apostaron e impulsaron, de manera ininterrumpida, la ciencia argentina.

Esta tesis fue realizada, así como mi carrera de grado, en instituciones públicas y financiada por subsidios del Estado argentino. Incluso fui becado por el CONICET durante los 5 años que llevó concretarla para poder ofrecerle dedicación exclusiva.

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

CONTENIDO	Página
1. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Inmunosupresión y producción avícola	13
2.2. Respuesta antiviral en aves	15
2.2.1. Interferones de tipo 1- INF α	16
2.2.2. Citoquinas proinflamatorias	16
2.2.3. Quemoquinas	17
2.3. Sistema inmune aviar	18
2.4. El virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV)	19
2.4.1. IBDV, entrada y primeros pasos	22
2.4.2. IBDV, fase aguda de la infección y signos clínicos	23
2.4.3. IBDV, prevención de la enfermedad	23
2.5. Biología molecular del IBDV	24
2.5.1. Entrada	24
2.5.2. Replicación	25
2.5.3. Salida	25
2.6. Apoptosis e IBDV	25
2.7. La proteína viral VP5 de IBDV	26
2.7.1. La proteína VP5 de otros miembros de la familia <i>Birnaviridae</i>	27
2.8. Localización subcelular de proteínas	27
2. HIPÓTESIS	30
3. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo General	32
4.2. Objetivos Específicos	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Animales y Toma de Muestras	34
5.2. Virus	34
5.3. Cuantificación de ARN mensajeros	35
5.3.1. Obtención de ARN mensajero	35
5.3.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	36
5.3.3. Obtención de los estándares de PCR en tiempo real	37
5.3.4. Amplificación por PCR en tiempo real de muestras de concentración conocida	37
5.3.5. Amplificación por PCR en tiempo real de muestras de concentración desconocida	38
5.4. Análisis de las poblaciones celulares por Citometría de Flujo	39

5.5. Estimulación <i>in vitro</i> de esplenocitos	40
5.6. Coinfección con el virus de la Bronquitis infecciosa	41
5.7. Cultivos celulares	41
5.7.1. FEP	41
5.7.2. DT-40	41
5.7.3. QM-7	41
5.8. Infecciones en cultivo celular	42
5.9. Análisis de la inducción de apoptosis	42
5.9.1. Análisis del ciclo celular por tinción con Ioduro de Propidio	42
5.9.2. Expresión génica de Caspasa 3	42
5.9.3. Medición de la activación de Caspasa 3	42
5.10. Análisis de la localización subcelular de VP5	43
5.10.1. Análisis <i>in silico</i> de putativos dominios de transmembrana	43
5.10.2. Construcción de Vectores (pYFP, pCFP, pYFP-VP5, pVP5-CFP y <i>pCherry</i>)	44
5.10.3. Transfecciones	45
5.10.4. Observación de Fluorescencia en Células Vivas	45
5.10.5. Colocalización en la membrana plasmática	46
5.10.5.1. Colocalización de VP5 con un colorante de membrana	46
5.10.5.2. Colocalización de VP5 con una conocida proteína de transmembrana	46
5.10.6. Permeabilización de las células cotransfectadas	46
5.10.7. Ensayos de protección de la fluorescencia a la proteasa	47
5.11. Análisis estadístico	47
5. RESULTADOS	49
6.1. Primera parte. Respuesta inmune aviar a IBDV	49
6.1.1. Elección de las dosis de IBDV utilizadas	49
6.1.2. Análisis de la expresión de citoquinas en animales inoculados con IBDV por distintas vías	51
6.1.3. Análisis de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta a IBDV	54
6.1.4. Inmunosupresión	54
6.1.4.a. Análisis de la activación de esplenocitos de aves inoculadas con IBDV	54
6.1.4.b. Coinfección con otros patógenos	55
6.1.5. Inducción de apoptosis	57
6.1.5.a. Análisis del estadio celular por tinción con Ioduro de Propidio	57

6.1.5.b. Análisis de la activación de Caspasa 3	60
6.1.5.c. Análisis de la expresión génica de Caspasa 3	61
6.2. Segunda parte. Análisis de la localización subcelular de la proteína VP5	62
6.2.1. Dominios de transmembrana de VP5 predichos <i>in silico</i>	63
6.2.2. Localización de la proteína VP5	65
6.2.3. Colocalización de las fusiones con un marcador de membrana plasmática y una proteína conocida de membrana	66
6.2.4. La proteína VP5, ¿está asociada a la membrana plasmática?	67
6.2.5. Análisis de la topología de VP5 en la membrana plasmática de células transfectadas	68
6. DISCUSIÓN	73
7. CONCLUSIONES	85
8. REFERENCIAS	87

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**



2. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el sector avícola manifestó una importante evolución en todos sus indicadores productivos. En 2013 la producción mundial de carne aviar alcanzó más de 84,5 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 2,19 % en relación con el año 2012. El mercado local se encuentra firme y en expansión; así, el consumo per cápita aumentó de 19 kg/cap/año en 2003 a 39,5 kg/cap/año en 2013 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). Dicho crecimiento se dio en un contexto de cambios políticos y económicos a nivel nacional e internacional. En forma simultánea, el sector avícola fue incorporando mejoras tecnológicas en diversas áreas de la producción.

La bioseguridad y la sanidad constituyen, junto con el desarrollo de la genética, los pilares sobre los cuales se basa el incremento de la capacidad competitiva del sector. Las grandes pérdidas en la productividad debidas a enfermedades infecciosas en aves son un problema sumamente importante y, por lo tanto, para propiciar un continuo y robusto desarrollo de la industria avícola, se requiere un estricto control sanitario.

Uno de los patógenos que afecta la producción avícola es el virus de la bursitis infecciosa (*Infectious Bursal Disease Virus*, IBDV). En este trabajo de Tesis estudiamos la respuesta inmune de pollos a este agente infeccioso para caracterizar patrones ligados al mecanismo de acción del virus en distintos órganos. También nos interesamos en una de las proteínas virales para aportar datos sobre su función y discutir su posible injerencia en el ciclo de infección.

2.1. Inmunosupresión y producción avícola

Existen varios factores que pueden afectar el estado general de las aves de producción, muchos de ellos derivados de la superpoblación que con frecuencia tiene lugar en los establecimientos de cría intensiva. En nuestro país, el 83 % de las granjas se sitúan en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Tabla 1). Particularmente en Entre Ríos las granjas se concentran en un área de 55 km² en el departamento de Concepción del Uruguay, denominada ruta J (Informe 2013 de Producción Avícola, Gobierno de Entre Ríos).

Provincia	Granjas	Porcentaje
Entre Ríos	2741	47,81
Buenos Aires	2044	35,65
Santa Fé	323	5,63
Córdoba	261	4,55
Mendoza	148	2,58
Río Negro	51	0,89
Salta	41	0,72
Neuquén	38	0,66
Tucumán	26	0,45
San Juan	24	0,42
Resto del país	36	0,64
Total	5733	100

Tabla 1: Número de granjas avícolas habilitadas por provincia. Fuente: Informe 2013 de Producción Avícola, Gobierno de Entre Ríos.

El estado sanitario general de los animales que se crían para el consumo humano es fundamental, especialmente cuando se trata de animales de producción intensiva como es el caso de la industria avícola.

Los agentes virales que destruyen células del sistema inmune dejan a las aves más susceptibles a la infección por otros patógenos, muchas veces conduciendo a situaciones de enfermedad crónica. Además, provocan deficiencias en la respuesta a la vacunación. IBDV es un agente inmunosupresor cuyo principal blanco de acción es la bursa de Fabricio, órgano exclusivo de las aves.

Las enfermedades inmunosupresoras causadas por agentes virales provocan pérdidas directas e indirectas. Las pérdidas económicas directas se deben a la mortalidad específica, dependiendo de la virulencia y la cantidad de virus que ingresó, la edad y raza de las aves y el estado en cuanto a inmunidad pasiva. Las pérdidas indirectas, en cambio, se deben a la inmunodeficiencia que adquieren los animales infectados y alteraciones en el crecimiento, entre otros factores (30).

Así, agentes infecciosos que podrían ser eliminados por pollos en condiciones sanitarias controladas, adquieren otra magnitud al enfrentarse a pollos inmunosuprimidos.

Datos aportados por el relevamiento realizado en la Estación Experimental Agropecuaria de INTA-Concepción del Uruguay durante el período 2007-2012, revelaron que al menos el 62 % de los casos positivos para el virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) también presentaban IBDV, CAV (virus de la anemia infecciosa del pollo, que también provoca inmunosupresión) o ambos, situación que se relaciona con la importancia del estado inmunitario del pollo al momento de la infección por IBV.

2.2. Respuesta antiviral en aves

En general, el sistema inmune de las aves está descripto con menos profundidad que el de mamíferos. Por esa razón, el abordaje de su estudio consistió en encontrar los homólogos funcionales de cada efector.

La primera defensa ante un ataque viral la brinda el sistema inmune innato cuya función depende del reconocimiento de patrones conservados asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). En los mamíferos, el ejemplo característico de estas moléculas son los receptores de tipo TOLL (TLR por sus siglas en inglés). Entre éstos, el TLR3, el TLR7, el TLR8 y el TLR9 detectan diferentes formas de ácidos nucleicos virales en distintos compartimentos de las células infectadas. En cambio, el TLR2 y el TLR4 están relacionados al reconocimiento de las proteínas estructurales y no estructurales de virus y su activación induce la producción de citoquinas inflamatorias. También hay evidencia de que el TLR13 puede reconocer específicamente la infección por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (90). A partir de la secuenciación del genoma del pollo, el primer animal de consumo cuyo genoma fue secuenciado (14), se han identificado varios ortólogos de TLR de mamíferos involucrados en la respuesta antiviral. Así, se identificaron el TLR3 y el TLR7; el gen que codifica el ortólogo del TLR 8, en cambio, se encuentra interrumpido y el gen del TLR9 que ha sido identificado en casi todos los vertebrados se encuentra deletado en el pollo.

El TLR3 de pollo tiene homología aminoacídica de alrededor del 48 % con el humano y se expresa en una amplia gama de células. Al igual que en el caso de su ortólogo, se demostró la capacidad de responder al poli IC, un análogo sintético al ARN doble cadena y un PAMP relacionado a la infección viral (31).

El TLR 7 de pollo expresado de manera ectópica en células de mamífero junto con el agregado de sus agonistas provoca la activación de la vía de señalización del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ que lleva al aumento de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (3). A su vez, la línea celular proveniente de macrófagos aviares HD11, al ser

infectada con el virus de Influenza aviar muestra un aumento en la expresión de este receptor (110).

Aunque, como se expresó más arriba, el TLR9 no se encuentra en el genoma del pollo, la administración de CpG-ODN (sus ligandos más importantes) aumenta la expresión de Interferón Gama (INF γ), IL-1 β , IL-6 e IL-8 *in ovo* y limita la propagación viral, lo que determina la existencia de un TLR en aves homólogo funcional del TLR9 de mamíferos (10).

2.2.1. Interferones de tipo 1 - INF α

Los interferones de tipo 1 constituyen la primera línea de defensa contra patógenos virales. El interferón de tipo 1 más estudiado en pollo es el Interferón alfa (INF α). Los primeros estudios *in vitro* sobre el INF α aviar mostraron que éste posee una fuerte actividad antiviral al observar el bloqueo de la lisis celular en cultivos infectados con VSV (83).

El INF α tiene un rol fundamental en la defensa contra diferentes infecciones virales como influenza (106), la enfermedad de Newcastle (54) y la bursitis infecciosa (56).

2.2.2. Citoquinas pro inflamatorias

INF γ

El Interferón Gama (INF γ) es una citoquina fundamental del perfil Th1, es un interferón de tipo 2, y es crucial en el control de infecciones que involucran patógenos intracelulares (43).

Las propiedades biológicas de esta citoquina han sido caracterizadas *in vitro*. Así, se observó que provoca un aumento marcado de la producción de nitrito en macrófagos. La misma actividad se detectó utilizando sobrenadantes de cultivos primarios de células de bazo de pollos tratados con Concanavalina A (ConA), un mitógeno de linfocitos T que provoca la producción de INF γ en esplenocitos murinos y humanos (107).

Las principales células productoras de esta citoquina son las NK (18), aunque se encontró producción de INF γ en líneas de linfocitos T estimuladas con ConA (84).

IL-6

La Interleuquina-6 (IL-6) fue una de las primeras citoquinas caracterizadas en aves. Su actividad biológica fue descrita en primera instancia a través de la

estimulación de monocitos de pato con lipopolisacárido (LPS). La misma posee actividad proinflamatoria tanto en pollos como en mamíferos. La producen varios tipos celulares, principalmente macrófagos y se secreta en las primeras fases post infección induciendo una fuerte respuesta innata (24).

In vivo, al inocular pollos con esta citoquina, se produce una fuerte inflamación que se evidencia en un aumento del cortisol circulante (82).

LITAF

En mamíferos, el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α) actúa como una citoquina proinflamatoria que induce la secreción de diversas citoquinas como la IL-1 y la IL-6, además de promover la secreción de nitrito por parte de los macrófagos (63).

En aves, la función homóloga al TNF α se ha observado en sobrenadantes de cultivo de una línea celular de macrófagos de pollos estimulados con LPS (77).

El clonado del TNF α aún no ha podido realizarse con éxito en especies aviares por lo que se asume que no existe su homólogo a nivel génico en aves (42, 91). El factor de transcripción de TNF α inducido por LPS (LITAF), fue caracterizado en mamíferos y, posteriormente, en pollos. La estimulación con LPS de macrófagos provoca la expresión del mensajero de LITAF; una vez transcrito, el factor se une al gen del TNF α promoviendo su transcripción, por lo que se lo utiliza como indicio de la expresión de TNF α (2).

IL-15

La Interleuquina-15 (IL-15) aviar muestra homología con su contraparte en mamíferos en varios aspectos. El gen que la codifica en aves consta de al menos dos codones iniciadores de la traducción (AUG) fuera del marco de lectura mientras que en ratón se conocen seis y en humanos doce. Éstos fueron propuestos como reguladores negativos de la traducción. La producción de esta citoquina por parte de los macrófagos y su capacidad de activar células NK y linfocitos T indican que juega un rol crucial en la inmunidad innata (45).

2.2.3. Quemoquinas

IL-8

La Interleuquina-8 (IL-8) es una quemoquina. Las quemoquinas constituyen un grupo de citoquinas que muestran la capacidad de ser quimioattractantes, es decir que provocan la migración de células inmunocompetentes. Su función se ha

caracterizado recientemente en pollos. Esta citoquina es capaz de promover la migración de monocitos heterófilos y de macrófagos, los últimos con menos eficiencia. Se produce en el tejido linfoide y su receptor ya ha sido caracterizado (73).

2.3. Sistema inmune aviar

Antes de comenzar con el desarrollo del ciclo de replicación del IBDV, es importante destacar algunos aspectos anatómicos de las aves y su sistema inmune, menos conocido que el sistema inmune de mamíferos.

En la Figura 1 se pueden observar los órganos clave del sistema inmune aviar.

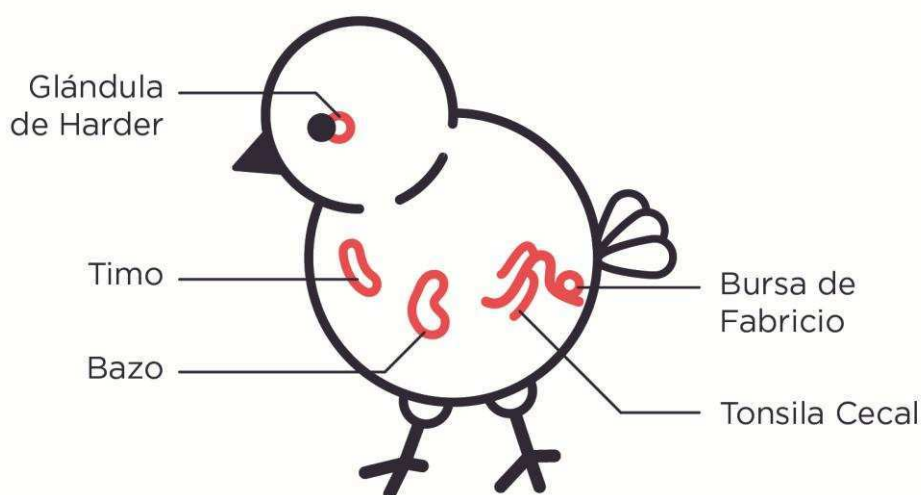


Figura 1: Principales órganos relacionados con el sistema inmune aviar. En la figura se muestra un esquema corporal del pollo resaltando la ubicación de los principales órganos del sistema inmune aviar.

Intestino

En el intestino de mamíferos existe un gran número de nódulos linfoides. En aves, en cambio, estudios histológicos revelaron un extensivo y difuso tejido linfoide en la lámina propia del intestino desde el comienzo del duodeno. Existen, sin embargo, zonas estratégicas donde se concentran funciones del sistema inmune, como el desarrollo de linfocitos y la presentación antigénica. Las más importantes son las tonsilas cecales (66).

Bazo

Como ya hemos mencionado, el pollo está desprovisto de ganglios linfáticos, pero su bazo es un órgano linfoide secundario que está organizado de manera muy diferente al de los mamíferos y se destacan tres áreas: vainas de linfocitos periarteriolas que poseen capas musculares visibles donde predominan los linfocitos T, vainas de linfocitos perielipsoides que poseen linfocitos B sin capas musculares visibles y folículos con centros germinales (33).

Timo

El timo es el órgano donde se desarrollan los linfocitos T. Las células que les dan lugar acceden a este órgano a través del torrente sanguíneo en tres sucesivas infiltraciones entre el día 8 y el 18 post nacimiento de las aves (8).

Glándula de Harder

La parte superior de la glándula próxima al lagrimal (glándula de Harder) puede ser caracterizada como un tejido linfoepitelial que se compone de linfocitos pequeños y medianos, células dendríticas y macrófagos. Las vénulas endoteliales son responsables de la migración y *homing* de linfocitos T por lo que se considera a esta glándula un órgano linfoide secundario (67) .

Bursa de Fabricio

La bursa de Fabricio es uno de los órganos que más ha aportado al conocimiento de la inmunología, pues gracias a él se determinó la existencia de 2 componentes igualmente importantes del sistema inmune: la inmunidad humoral cuyos protagonistas son los anticuerpos y la inmunidad mediada por células (97).

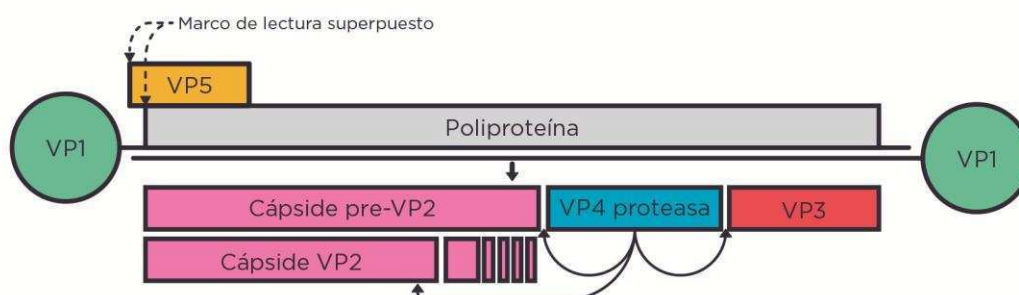
2.4. El virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) es el agente causante de una enfermedad aguda y altamente contagiosa que ataca especialmente a animales jóvenes, pudiendo ocasionar inmunosupresión (30). Un factor que contribuye a su peligrosidad es la alta estabilidad que posee en el medio ambiente y su capacidad de transmitirse por vía aérea (32).

El IBDV pertenece a la familia *Birnaviridae*, su genoma es de ARN doble cadena y está dividido en dos segmentos (Figura 2). Posee cinco proteínas virales: VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5. La proteína VP1 es una polimerasa de ARN dependiente de ARN y está codificada por el segmento pequeño del genoma denominado "B". El segmento mayor, "A", codifica las restantes proteínas. VP2 y VP3 son las proteínas

estructurales del virión, siendo VP2 fuertemente inmunogénica, por lo que es muy estudiada como inmunógeno recombinante (22, 87, 88). La proteína VP4 es una proteasa viral y la función de VP5, que se discutirá más adelante, es aún un punto de conflicto en la literatura.

Segmento A



Segmento B

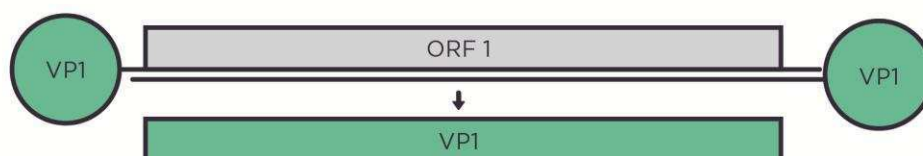


Figura 2: El genoma viral. Se muestra una representación del genoma viral compuesto por dos fragmentos de ARN doble cadena. En el segmento A se observa, en un marco de lectura superpuesto, el gen que codifica para la proteína VP5.

Se conocen dos serotipos de este virus: el serotipo I y el serotipo II. Los virus pertenecientes al primer serotipo son los únicos que pueden ocasionar signos clínicos, mientras que los del serotipo II, aislados de patos silvestres, no son virulentos para pollos. Los virus del serotipo I se clasifican, según su patogenicidad, en “Altamente Virulentos” que provocan alta mortalidad, “Virulentos” que poseen una tasa de mortalidad media, “Atenuados” que no causan enfermedad en pollos y “Medios” que pueden ocasionar cierto grado de atrofia en la bursa de Fabricio. Virus provenientes de este último grupo se utilizan en la elaboración de vacunas a virus vivo (5).

A partir de 1990, en Estados Unidos, el norte de Europa y el sur de Asia se comenzaron a aislar cepas resistentes a la vacunación, que causaban mayores daños en la bursa de Fabricio. Se las denominó “Cepas Variantes” y a las anteriormente descritas, “Cepas Clásicas” (53).

El IBDV tiene tropismo por diferentes células del sistema inmune, en particular por los linfocitos B que expresan IgM en su membrana, es por esto que replica mayoritariamente en la bursa de Fabricio. Sin embargo, si bien los linfocitos B constituyen el principal blanco del virus, los macrófagos poseen un rol fundamental en la patogénesis viral dado que está demostrado que el virus replica en este tipo celular. Se postula que a través de los macrófagos residentes asociados al intestino el virus llega al órgano blanco. A su vez, el IBDV provoca una disminución del número de macrófagos en el bazo, lo que puede tener implicancias en la inmunosupresión sistémica provocada por este patógeno (70).

Una vez en la bursa de Fabricio, la replicación viral provoca una fuerte depleción de linfocitos B, junto con la infiltración de linfocitos T en este órgano, probablemente debida a las citoquinas quimioattractantes que liberan los macrófagos, como la IL-8, cuya expresión se ve aumentada en la bursa de Fabricio de animales infectados.

Hasta hace algunos años, debido a la depleción de los linfocitos B que provoca la infección viral, se pensaba que la bursitis infecciosa era específicamente una enfermedad que atacaba el sistema inmune humoral. Sin embargo, más tarde se demostró que la infección viral es capaz de provocar también una inmunosupresión a nivel celular generada, entre otros aspectos, por la infiltración de linfocitos T en la bursa y su posterior inactivación, y la disminución de la población de macrófagos en el bazo de los animales infectados (Figura 3) (30).

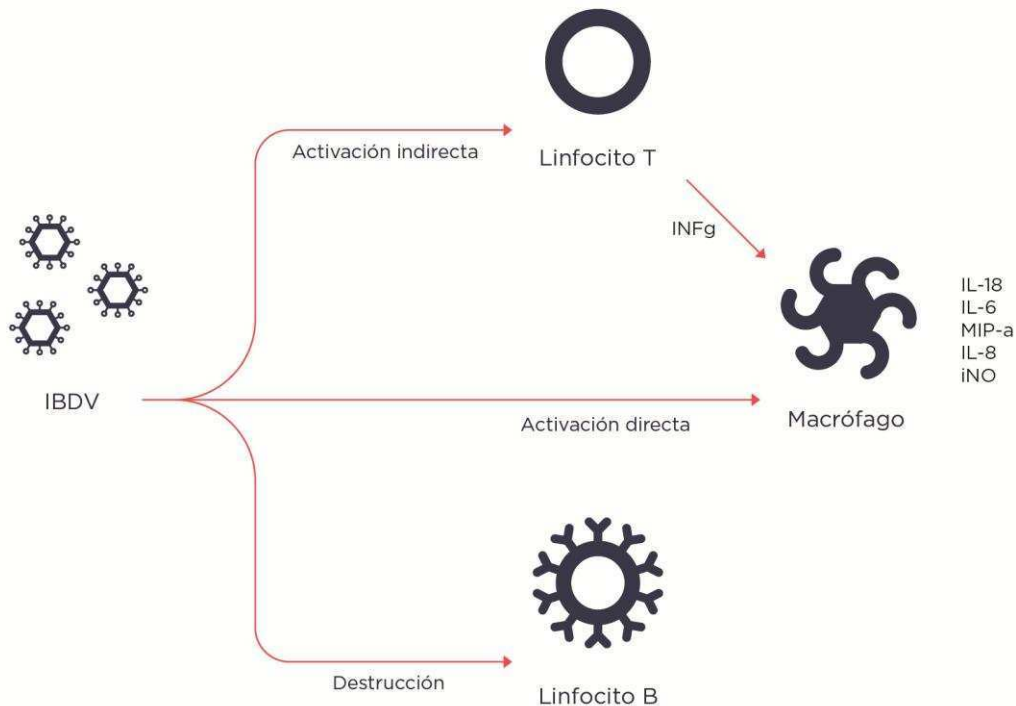


Figura 3: Modelo de inmunosupresión causada por IBDV. Adaptado de Ingrao y colaboradores, 2013.

2.4.1. IBDV, entrada y primeros pasos

En general, los signos clínicos de la enfermedad aparecen en pollos de entre 3 y 6 semanas de edad, cuando la bursa de Fabricio alcanza su mayor grado de desarrollo. Los pollos de hasta 2 semanas, además de no haber desarrollado completamente este órgano, en general están protegidos por los anticuerpos maternos. En aves mayores a 6 semanas de edad, es raro encontrar signos clínicos de IBDV (17).

Actualmente, se acepta la teoría de que, tras la ingestión de la materia contaminada con IBDV, el virus es incorporado por los macrófagos residentes del intestino del animal y luego transportados por éstos a otros tejidos. Después de llegar a la bursa de Fabricio, el virus replica activamente en los linfocitos B que portan IgM en su membrana. La infección ocasiona una rápida disminución de la población de células B de la bursa y de otros órganos linfoides, tales como el bazo, el timo y las tonsilas cecales. La destrucción de poblaciones de linfocitos asociada a la infección causa la supresión inmune y dificulta la maduración inmunológica de las aves infectadas (30).

2.4.2. IBDV, fase aguda de la infección y signos clínicos

La fase aguda de la infección por IBDV provoca, de acuerdo al grado de virulencia de la cepa viral, entre otros signos clínicos, anorexia, depresión, diarrea, postración y en muchos casos, la muerte (87). En el caso de recuperarse de esta fase, el ave experimenta inmunodepresión. La replicación del virus en la bursa de Fabricio se relaciona con los daños que se observan en este órgano: gelatinización, necrosis y hemorragia. Estos signos se utilizan para tabular el grado de lesión que presentan los animales y generar un índice de lesión en la bursa de Fabricio. Cepas de menor virulencia pueden no manifestarse clínicamente pero provocar cierto grado de atrofia en la bursa de Fabricio dejando a los animales susceptibles a nuevas infecciones (79).

2.4.3. IBDV, prevención de la enfermedad

El principal método para la prevención de la enfermedad es la vacunación.

Las vacunas a virus vivo imitan la infección en el hospedador dado que los virus que contienen pueden replicar e inducir respuesta celular y humoral y son compatibles, por ejemplo, con las inmunizaciones en el agua de bebida de los animales. De todos modos, este tipo de vacunas tiene efectos indeseados como son la posible reversión de la virulencia y reacciones a la vacunación que pueden provocar enfermedad o pérdidas en la producción (60).

En general, las vacunas a virus vivo se producen mediante pasajes seriados en huevos o cultivos celulares hasta obtener una cepa capaz de inducir una respuesta inmune adecuada y no generar enfermedad. La mayor parte de las vacunas comerciales a virus vivo de IBDV están basadas en cepas clásicas virulentas y se clasifican como “cepas de virulencia intermedia” que exhiben poca eficacia en presencia de anticuerpos maternos. Así, se desarrollaron cepas de mayor virulencia o “plus” que son más eficaces en esta condición. Ambas, además, pueden causar algunos signos clínicos menores que, en conjunto con otros factores como el hacinamiento o infecciones con otros patógenos, pueden ser sanitariamente relevantes (59, 62, 96).

Las vacunas no replicativas, como las basadas en virus inactivados, en antígenos recombinantes o vacunas a subunidades, aunque son mucho más seguras que las anteriores, presentan, en general, poca eficacia y requieren del agregado de adyuvantes para potenciar la respuesta que generan. Además, en general es necesario realizar múltiples inoculaciones del antígeno por vía intramuscular. Estas características son muchas veces incompatibles con la producción intensiva. Por este motivo, las vacunas de este tipo se utilizan para potenciar la respuesta

generada por una vacunación previa. El uso más frecuente de este tipo de vacunas está orientado a lograr un título adecuado de anticuerpos en los huevos de aves reproductoras para pollos de engorde por lo que se las inocula antes de la postura (76).

Otro tipo de vacunación es la basada en vacunas vivas vectorizadas cuyo fundamento es la introducción de los antígenos del patógeno a combatir en un organismo donador (que también puede ser una cepa vacunal de otro virus). Un ejemplo de este tipo de vacunas es la vacuna basada en Herpesvirus de pavo (HVT), utilizada durante décadas contra el virus de la enfermedad de Marek, a la cual se le introdujeron, mediante ingeniería genética, antígenos de diferentes patógenos. En el caso de IBDV, se introdujo el gen de la proteína VP2 generando un virus recombinante que indujo en aves una adecuada respuesta contra ambas enfermedades y en presencia de altos títulos de anticuerpos maternos contra IBDV (41). Esta vacuna se utiliza comercialmente en el país en inoculaciones *in ovo*.

El campo de las vacunas se encuentra en permanente desarrollo y se está estudiando la eficacia de distintos tipos de vacunas de nueva generación para lograr vacunas seguras, que generen una respuesta adecuada y cuya aplicación sea compatible con la producción a gran escala (60).

2.5. Biología molecular del IBDV

2.5.1. Entrada

La estrategia de replicación viral es poco conocida en la familia *Birnaviridae*. Existen algunos reportes que dan indicios sobre la identificación del receptor celular de estos virus pero no está totalmente identificado aún el complejo receptor.

La inmunoglobulina del tipo M (IgM) de la membrana plasmática de los linfocitos B fue el primer putativo receptor estudiado. Se determinó que la IgM forma parte del complejo de entrada de IBDV ya que, en cultivo de linfocitos B, el tratamiento con anticuerpos anti-IgM fue capaz de inhibir la replicación viral de una cepa altamente virulenta del IBDV. Sin embargo, pasajes ciegos en cultivo de células promueven la adaptación a otros tipos celulares que no necesariamente tienen este receptor, como son los fibroblastos de embrión de pollo o las células QM-7 que se utilizan en el presente trabajo, lo que indicaría que IBDV posee receptores celulares alternativos (65).

Efectivamente, un receptor alternativo a IgM fue propuesto por Lin y colaboradores quienes determinaron que la proteína de choque térmico 90 forma

parte del complejo receptor del virus en las células hospedadoras ya que la neutralización mediada por anticuerpos de este putativo receptor inhibe la entrada del virus (47).

A su vez, Delgui y colaboradores encontraron un triplete aminoacídico estrictamente conservado en la poliproteína de la cápside del virus cuya mutación impide la entrada del virión a las células hospedadoras. Ese triplete corresponde a la secuencia consenso de unión a la integrina $\alpha 4\beta 1$ y es esencial que las células lo posean para que sean susceptibles a la infección (12).

Recientemente se determinó que IBDV utiliza la vía endocítica para ingresar a la célula hospedadora (111). Por otro lado Galloux y colaboradores sugirieron que la desencapsidación del virus ocurre dentro del endosoma en respuesta al bajo pH de este compartimento (19).

2.5.2. Replicación

Varios virus a ARN replican su genoma en estructuras complejas llamadas fábricas virales cuya maquinaria se inserta dentro de vesículas recubiertas por membranas simples o dobles que en general se asocian a diferentes estructuras celulares como por ejemplo el retículo endoplásmico rugoso o las mitocondrias. La replicación de IBDV se ajusta a este modelo. Se describió que los complejos ribonucleoproteicos virales de IBDV (las proteínas VP1 y VP3 y el ARN viral) se acumulan en los endosomas tempranos y en apilamientos pegados al aparato de Golgi formando un tipo particular de fábrica viral (13).

2.5.3. Salida

Respecto a la etapa de salida del virus, existe aún menos información. Dado que es un virus desnudo, se acepta que la lisis celular y la apoptosis que genera especialmente en la bursa de Fabricio facilita la salida de los viriones. Asimismo, está demostrada la capacidad de IBDV de alterar la estructura de la membrana plasmática de distintos tipos celulares (19). Por otro lado, se sugirió que la proteína no estructural VP5 participa del proceso de salida del virus, aunque sólo un reporte demostró este efecto en células humanas (109).

2.6. Apoptosis e IBDV

Poco después del descubrimiento del virus se determinó su capacidad de inducir apoptosis en distintos tipos celulares y en la bursa de Fabricio, órgano en el que se pueden detectar islas apoptóticas, entre otros efectos característicos de la infección, cuando se realiza un estudio patológico de un ave infectada (99). Luego,

dada la presencia del Citocromo C en el citoplasma de las células infectadas se infirió que la vía intrínseca de este proceso sería la responsable (85).

Asimismo, se ha demostrado en una amplia variedad de células de ave y de mamífero infectadas con virus Vaccinia recombinantes para VP5, que la expresión de dicha proteína en ausencia de otros genes virales induce un apagado completo de la traducción y la consecuente apoptosis (51). En la próxima sección nos detendremos en VP5 y la controversia sobre su rol en la etapa de apoptosis.

Por otro lado, se le asignó a VP3 un rol anti apoptótico a partir de su interacción e inhibición de la proteína quinasa R, la cual se encarga de despertar una respuesta ante estímulos asociados a la infección viral como es el ARN doble cadena en células aviares y de mamífero que expresan VP3 (4).

A su vez, Tanimura y Sharma y luego Jungmann y colaboradores, investigaron secciones de la bursa de Fabricio de animales inoculados con una cepa altamente virulenta de IBDV. Ambos grupos observaron tanto células apoptóticas positivas para IBDV como células apoptóticas negativas por lo que concluyeron que la infección viral induce la apoptosis no sólo en las células infectadas (34, 92).

2.7. La proteína viral VP5

La proteína VP5 de IBDV es una proteína no estructural. La región del genoma que la codifica se encuentra en el extremo 3' del segmento genómico mayor y su marco de lectura está parcialmente superpuesto con el de la poliproteína VP2-VP3-VP4 (Figura 2). Es una proteína rica en cisteínas y se encuentra muy conservada entre las cepas del serotipo I de IBDV (61).

Lombardo y colaboradores demostraron que la proteína VP5 se acumula en la membrana plasmática e induce la lisis de distintos tipos celulares de ave y de mamífero (51). Más tarde, Liu y Vakharia notaron que la proteína es capaz de inhibir la apoptosis en estadios tempranos de la infección (49). Por otra parte, Wu y colaboradores observaron, como se mencionó más arriba, que la falta de la proteína VP5 provoca una disminución de la salida del virión de células infectadas, pero demostraron que esta proteína no está involucrada en la lisis celular (109). En sintonía con el trabajo de Liu y Vakharia, Wei y colaboradores observaron que la proteína VP5 interactúa con la subunidad alfa de la proteína Pi3K y esta interacción provoca una cascada de señalización que protege a la célula de la apoptosis (105). En contraposición a este último trabajo, Li y colaboradores demostraron que VP5 es el principal inductor apoptótico de IBDV y colocaliza con canales dependiente de voltaje en mitocondrias. Esta interacción es esencial para la apoptosis inducida por el virus (44). En un trabajo más reciente, los mismos autores comprobaron la

interacción de esos canales con la proteína RACK1 y a su vez con VP5 formando, posiblemente, un complejo. Llamativamente, la sobreexpresión de RACK1 inhibe la apoptosis que causa IBDV y su subexpresión induce apoptosis e inhibe el crecimiento viral. De ese modo, los autores proponen que, durante la infección con IBDV, VP5 secuestra esta proteína junto con los canales de voltaje de la mitocondria, induciendo la apoptosis y permitiendo la salida del virus (48).

Esto demuestra que, hasta el momento, el rol de la proteína no estructural no está totalmente definido y existen reportes que le otorgan funciones contrapuestas en cuanto a la capacidad de inducir o inhibir la apoptosis. No podemos descartar la posibilidad de que VP5 cumpla diferentes funciones según la etapa del ciclo de replicación viral que estudiemos, adaptándose a las necesidades del virus en cada una de ellas.

2.7.1. VP5 y otros miembros de la familia *Birnaviridae*

La familia *Birnaviridae* posee muy pocos virus caracterizados, siendo IBDV, el más estudiado.

Aunque con menos detalle que el IBDV, el virus de la necrosis pancreática de salmón (IPNV) está bien caracterizado ya que es un patógeno de alta relevancia en la industria piscícola que causa alta mortalidad en salmónidos jóvenes infectados y está distribuido alrededor del mundo. Su genoma, al igual que el de IBDV, está constituido por dos fragmentos de ARN doble cadena y posee cinco proteínas virales. A la proteína VP5 de IPNV, que posee un 34 % de identidad con la del virus aviar, se le asigna un rol inequívocamente antiapoptótico dada su similitud con la proteína Bcl-2 (46).

Existen además otros dos miembros de la familia descubiertos posteriormente y que están menos estudiados: el Virus X de *Drosophila* (DVX), descubierto a partir de un cultivo primario de células de moscas infectadas (1), y el Virus Espirito Santo (ESV), que fue recientemente caracterizado a partir de una contaminación ocurrida en células de mosquito infectadas con el virus del Dengue (98). En estos dos virus la función de la proteína VP5 aún no ha sido descripta.

2.8. Localización subcelular de proteínas

La localización subcelular de una proteína es fundamental para el desarrollo de su función ya que determina el acceso a contrapartes de posibles complejos de interacción y a la maquinaria de modificación postraduccional. Igualmente permite su integración en redes funcionales (29).

En particular, las proteínas virales deben regular finamente su localización subcelular durante el ciclo de replicación viral para que éste pueda completarse (81).

Para definir la posición de proteínas localizadas en membranas celulares, Lorenz y colaboradores desarrollaron el método de protección a la proteasa. Éste consiste en la construcción de un gen quimérico en donde el gen que codifica para la proteína en estudio es fusionado en sus extremos a genes de proteínas fluorescentes con los que luego se transfectan células que finalmente serán tratadas con una proteasa. Dependiendo de la posibilidad de acción de la proteasa sobre cada extremo de la proteína quimérica, se determina su orientación en la membrana celular (52).

En la Figura 4 se puede observar la dinámica del método a partir de células transfectadas y sometidas a la proteinasa, la cual podrá acceder a las proteínas fluorescentes que se encuentren del lado extracelular, degradándolas proteolíticamente y apagando así su fluorescencia.

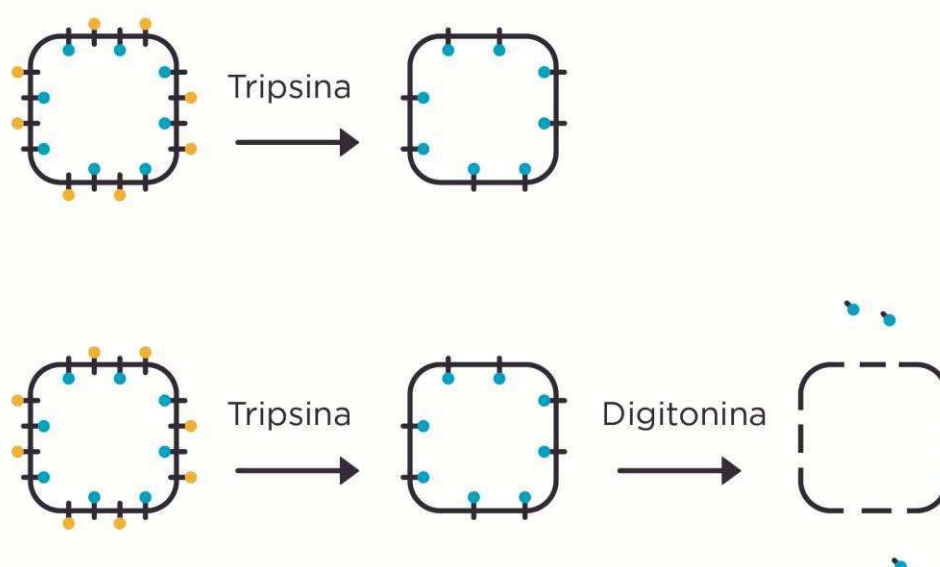


Figura 4: Representación del método de protección de la fluorescencia a la proteasa (FPP). La figura muestra esquemáticamente la fluorescencia fusionada a la proteína de interés como un círculo celeste o amarillo. La proteasa apaga la fluorescencia si es capaz de acceder a ella. La explicación detallada del método se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

3.

3. HIPÓTESIS

La inmunología aviar es un campo poco conocido respecto a su contraparte en mamíferos. El IBDV es un agente que causa una enfermedad altamente relevante en la industria avícola.

Hasta el momento, no se ha caracterizado en profundidad ni la respuesta inmune ni la inmunosupresión que inducen cepas de virulencia intermedia como tampoco el efecto de diferentes vías de inoculación.

Por otro lado, la información disponible acerca de la función y la localización subcelular de la proteína viral VP5 no es completamente concluyente.

El presente trabajo se basa en la hipótesis de que el estudio comparativo de la respuesta inmune aviar inducida por una cepa de virulencia intermedia de IBDV inoculada por las vías oral e intramuscular aportará elementos relevantes para el conocimiento de la capacidad que posee el virus de acceder a sus células blanco, replicarse e inducir inmunosupresión. Asimismo, de lograr imitar mediante el uso de distintas dosis de virus de cepas de virulencia intermedia los efectos que provocan cepas altamente virulentas, se podrá generar una herramienta de desafío sin la necesidad del uso de patógenos peligrosos.

Por otro lado, el estudio de la localización subcelular de la proteína VP5 y su papel en la apoptosis podrán brindar datos sobre su función y esclarecer el rol que tiene esta proteína en la replicación viral.

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**



4. OBJETIVOS

Por lo expuesto, planteamos los siguientes objetivos:

4.1 Objetivo general

Caracterizar aspectos clave de la interacción de IBDV con su hospedador, focalizando en la respuesta inmune celular inducida y en el rol que cumple la proteína viral VP5 en dicha interacción.

4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la respuesta inmune a nivel de expresión de mensajeros de citoquinas y poblaciones celulares involucradas en distintos órganos en animales inoculados por vía oral ó intramuscular con una cepa de virulencia intermedia del IBDV.
2. Estudiar la apoptosis en células aviares infectadas con IBDV en cuanto al contenido de su genoma, la expresión génica del mensajero de Caspasa 3 y la activación de esta proteína.
3. Determinar la localización subcelular y la topología de la proteína viral VP5.

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales y toma de muestras

Para realizar los experimentos con animales se utilizaron pollos White Leghorn. Los pollos nacieron en el bioterio del Instituto de Biotecnología del INTA, Castelar, a partir de la incubación de huevos embrionados (Rosenbusch SA, CABA, Argentina) libres de patógenos específicos (SPF) (incubadora Yonar SA, CABA, Argentina).

Una vez nacidos, los animales se mantuvieron bajo lámpara por dos semanas para luego ser alojados en jaulas individuales. A los pollos se les suministró alimento adecuado en cada etapa (iniciador en los primeros quince días y de adulto luego).

Los animales fueron inoculados en todos los casos a las 3 semanas de edad, período en el que son altamente vulnerables al IBDV. En los tiempos estipulados, los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂ y, según cada caso particular, se les extrajo la bursa de Fabricio, el bazo y/o el duodeno. Del primer órgano se obtuvo un pequeño fragmento de aproximadamente 0,3 mg que se mantuvo en 300 µl de solución estabilizadora de ARN (RNAlater, Ambiom™) hasta su utilización para la posterior obtención de ARN mensajero. El resto de la bursa se mantuvo en medio RPMI para el posterior aislamiento de linfocitos. Del bazo también se obtuvo un pequeño fragmento, que se mantuvo en solución estabilizadora de ARN hasta el momento de extracción y el resto del órgano se mantuvo en RPMI para el aislamiento de poblaciones celulares linfoides. Para el caso del duodeno, se tomó un pequeño fragmento sólo para el aislamiento de ARN.

Todos los procedimientos que involucran animales fueron aprobados por el comité institucional de uso y cuidado de animales de experimentación (CICUAE-CICVyA INTA).

5.2. Virus

El virus utilizado en este trabajo fue la cepa LZD de IBDV (Laboratorio Inmuner, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina). Esta cepa pertenece al serotipo I del virus, clasificada de virulencia intermedia. Originalmente fue desarrollada por la empresa Intervet en Holanda y su nombre original fue LZD Gumboro Delvax. La semilla liofilizada fue reconstituida en 10 ml de PBS.

El virus fue amplificado en cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo (FEP). Brevemente, se infectaron botellas de 150 cm² (Corning™) conteniendo aproximadamente 10⁸ células (preparado por el Servicio de Cultivo de Tejidos celulares, Instituto de Virología, INTA, Castelar) con 500 µl del stock viral. Luego de 48 hs de incubación a 37°C, se observó la presencia de efecto citopático y se

procedió a cosechar el virus mediante tres ciclos de congelado y descongelado a -80 °C y centrifugación del sobrenadante del cultivo celular a 10000 rcf por 10 minutos para descartar los restos celulares. Luego se tomó el sobrenadante que fue titulado mediante diluciones al décimo en placas de 96 pocillos sembradas con 10^5 células por pocillo observando el efecto citopático. Se calculó el título obtenido por el método de Reed y Muench obteniéndose un valor de $3,4 \times 10^7$ UFP/ml [$4,6 \times 10^7$ dosis infectivas en cultivo celular 50 (DICT₅₀/ml)].

La identidad del virus amplificado se analizó mediante la amplificación de un fragmento variable del gen de la proteína VP2 utilizando los *primers*:

VP2Fw: GAGTCTACACCATAACTGGA

VP2Rv: CGGAGGGCCCCTGGATGTT

El fragmento amplificado, de 241 pares de bases, fue clonado en un vector pGEM-T y la identidad del inserto fue analizada a partir de la secuenciación (Servicio de Genotipificación y Secuencia, INTA, Castelar) a partir de los iniciadores SP6 y T7 que aporta el plásmido.

5.3. Cuantificación de ARN mensajero

5.3.1. Obtención de ARN mensajero

A partir de los fragmentos de tejido o de las muestras provenientes de cultivos celulares, se aisló ARN utilizando TRIZOL (Invitrogen™) según el protocolo del fabricante. El mismo consistió básicamente en la lisis total de la muestra, la posterior extracción orgánica con cloroformo y la purificación del ARN por precipitación con etanol. Luego de la extracción, el ARN se cuantificó utilizando un Nanodrop N100 (Thermo Scientific™) el cual mide, además de la concentración de ARN, la relación de absorbancia 260/280nm que da cuenta de la pureza del ARN, siendo un valor mayor a 2 indicativo de un alto grado de pureza.

El ARN obtenido y cuantificado se trató con una nucleasa específica de ADN (DNase 1, Invitrogen™). A 2 µl de la solución de ARN se le agregaron 7 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de solución buffer en concentración 10X y 1 µl de la nucleasa conteniendo 2 UE. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego del agregado de 1 µl de EDTA 20 µM, se continuó la incubación a 70 °C durante 10 minutos con el fin de desnaturalizar la enzima.

Una vez obtenido el ARN libre de ADN se procedió a realizar la transcripción reversa. Para ello se utilizó la enzima RT SuperScript III (Invitrogen™). A los 12 µl de la solución de ARN del paso anterior, se le adicionaron 0,5 µl de hexámeros de

nucleótidos al azar y 1 µl de una solución 10 mM de nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y TTP). Se incubó la mezcla 10 minutos a 65 °C y luego se transfirió inmediatamente al hielo. Posteriormente, se agregó 1 µl de la solución inhibidora de nucleasas de ARN (RNase OUT, Invitrogen™), 4 µl de solución buffer en concentración 5X y 1 µl de la solución de enzima retrotranscriptasa en concentración 2 UE/µl. La mezcla se incubó a 50 °C durante 45 minutos y se detuvo la reacción calentando la muestra a 65 °C por 10 minutos. De este modo se obtuvo el ADNcopia de las muestras de ARN.

5.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de las muestras de ADNcopia del paso anterior, se realizó la PCR ajustando las condiciones de termociclado según la temperatura de *melting* de los oligonucleótidos iniciadores (*primers*), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Número de acceso (genebank)	Tamaño del amplicón
¹ LITAF Fw	CCATCTGCACCACCTTCA	NM_204267.1	184
¹ LITAF Rv	TTGCTGCACATACACAGT		
¹ IL-8 Fw	ATGAACGGCAAGCTTGGA	NM_205018.1	190
¹ IL-8 Rv	GCAGTGGGGGCCGCTTGG		
¹ IL-15 Fw	ACAGCCATTTCTTTTGCC	NM_204571.1	179
¹ IL-15 Rv	CTCGTATGTGTTTGCAGT		
¹ INF a Fw	CTCACGCTCCTTCTGAAA	NM_205427.1	174
¹ INF a Rv	CAGGATGGTGTCGTTGAA		
² INF g Fw	CAAAGCCGCACATCAAACA	Y07922	259
² INF g Rv	TTTCACCTTCTTCACGCCATC		
² IL-6 Fw	CAAGGTGACGGAGGAGGAC	AJ309540	254
² IL-6 Rv	TGGCGAGGAGGGATTCT		
³ CASP3 Fw	TGGCGATGAAGGACTCTTCT	NM_204725.1	160
³ CASP3 Rv	CTGGTCCACTGTCTGCTTCA		

⁴ IBV Fw	TCACTCGTTGCTTGGGCTA	X59820.1	274
⁴ IBV Rv	ACCAGAACCTGTCACCTC		
² GAPDH Fw	AGAACATCATCCCAGCGTCC	K01458	264
² GAPDH Rv	CGGCAGGTCAGGTCAACA		

Tabla 2: Primers utilizados. ¹Los primers fueron diseñados con el programa computacional CLC Clontech, ajustando las condiciones para PCR en tiempo real (sin estructura secundaria, contenido G+C del 50 % y Temperatura de melting de entre 55 y 60 °C).

²La secuencia de los primers fue obtenida de (27).

³La secuencia de los primers fue obtenida de (108).

⁴ La secuencia de los primers fue diseñada por el Dr. Ariel Vagnozzi del Instituto de Virología, INTA Castelar.

Los *primers* fueron diseñados de modo de amplificar fragmentos menores a 300 pb pertenecientes a regiones del mensajero de las mencionadas citoquinas, caspasas y del gen de expresión constitutiva Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

5.3.3. Obtención de los estándares de PCR en tiempo real

Conociendo la concentración de cada muestra de ADN plasmídico en ng/ml se obtuvo el número de copias del fragmento de interés según la fórmula (15):

$$\frac{\text{Masa (gramos)} \times \text{número de Avogadro}}{\text{prom. peso de una base} \times \text{long. del plásmido recombinante}}$$

Conociendo la concentración del templado en número de moléculas, se procedió a diluir la muestra realizando diluciones seriadas al décimo para construir el estándar de PCR en tiempo real.

5.3.4. Amplificación por PCR en tiempo real de muestras de concentración conocida

Las muestras obtenidas en el punto anterior fueron amplificadas por PCR en tiempo real. Para ello, a 1 µl de cada muestra de concentración conocida se le adicionaron 12,5 µl de solución madre de PCR del kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contiene la enzima Taq Polimerasa, SYBR green, y cloruro de magnesio; 0,5 µl de *primers* en concentración 100 ng/ml (Tabla 2) y 10,5 µl de agua desionizada. El procedimiento fue realizado por duplicado. Se

utilizó un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems), conectado a un ordenador. El perfil de termociclado se muestra en la Figura 5.

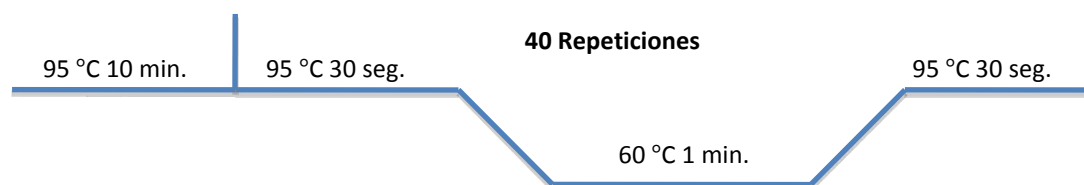


Figura 5: Perfil de termociclado. Se utilizó el termociclador ABI 7500 para todos los procedimientos de PCR en tiempo real.

Dado que el fluoróforo se intercala en el ADN doble cadena, se produce un aumento de la fluorescencia emitida que genera un patrón de amplificación. Este patrón fue analizado mediante el Software asociado al equipo utilizado (System Software ABI 7500, Applied Biosystems). Así, se determinó el valor medio del ciclo umbral de fluorescencia (Ct, ciclo al cual la fluorescencia emitida supera un valor umbral) de cada una de las muestras.

Con la media de los valores de Ct de 7 diluciones de cada citoquina se construyeron las curvas estándar para cada una de ellas. La curva estándar surge de graficar el valor de Ct en función del logaritmo de la concentración inicial.

Para confirmar la amplificación específica, se analizó el patrón de disociación. El mismo implica la medición de la fluorescencia emitida por la muestra a intervalos cortos de temperatura. Si la reacción fue específica, habrá un solo amplicón en la muestra y a determinada temperatura se desnaturalizará todo el ADN contenido y la fluorescencia disminuirá abruptamente. En cambio, si hubo amplificaciones inespecíficas habrá tantas caídas de la fluorescencia como amplicones en la muestra.

5.3.5. Amplificación por PCR en tiempo real de muestras de concentración desconocida

Habiendo obtenido curvas estándar adecuadas para la medición del número de copias de cada fragmento blanco, se procedió a analizar las muestras incógnita, es decir las muestras de ADN copia de cada experimento en particular. Utilizando los mismos *primers* que para las muestras de concentración conocida, se realizaron los ensayos de PCR en tiempo real de las muestras incógnita por duplicado. El valor obtenido del Ct de cada una fue extrapolado en la curva estándar (realizada en paralelo) puesta a punto según el ítem anterior con el fin de obtener valores del

número de copias de ADN de cada gen blanco. Dado que se había partido de ARN y se había degradado el ADN, es posible afirmar que se trata de copias de ARN mensajero.

5.4. Análisis de las poblaciones celulares por Citometría de Flujo

Las porciones de la bursa de Fabricio sumergidas en medio RPMI se cortaron en pequeños trozos que se disgregaron por presión con el émbolo de una jeringa. Las suspensiones celulares fueron pasadas a través de un filtro (cell strainer, BD™) y se aislaron las células mononucleares por centrifugación en gradientes de densidad Histopaque 1077 (Gibco™).

Las células viables (método de tinción con azul de tripán), se resuspendieron en buffer de marcación (PBS 1X, 10 % SFB, 0,1 % Azida sódica), se sembraron 1×10^6 células por pocillo de placa de 96 pocillos (fondo en V) y se lavaron 2 veces con el mismo buffer.

Se realizó la marcación resuspendiendo las células en 100 μ l de buffer de marcación incluyendo diferentes combinaciones de anticuerpos, o con uno único para el control de compensación y los controles de isotipo adecuados. Se incubaron las células 30 min a 4 °C, se lavaron 2 veces y se resuspendieron en la solución FACS flow para su posterior análisis por citometría de flujo.

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales (MAbs) que se detallan en la Tabla 3. Todos los MAbs son específicos de pollo y fueron adquiridos a la empresa Southern Biotech. Los anticuerpos fueron titulados previamente a fin de determinar la concentración óptima de cada uno para este ensayo.

Nombre	Fluorocromo conjugado
anti CD4 de pollo	PE
anti CD8a de pollo	FITC
anti CD8b de pollo	PE
anti CD3 de pollo	SPRD

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para los ensayos de caracterización de poblaciones celulares.

Asimismo, se realizaron los correspondientes controles de autofluorescencia y de isotipo. Para este último análisis se utilizaron anticuerpos anti ratón conjugados con FITC, PE y SPRD (Southern Biotech.).

La evaluación por citometría se realizó con un citómetro FACS Calibur (BD) y los resultados se evaluaron con el programa CellQuest (BD).

5.5. Estimulación *in vitro* de esplenocitos

Los esplenocitos obtenidos según el punto 5.1.4. se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 2 mM L-glutamina, antibiótico-antimicótico (Gibco™), 10 mM HEPES, 50 mM 2-mercaptoetanol y 10 % de Suero Fetal Bovino. Se sembraron 10^6 células por pocillo en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de concanavalina A (ConA; 5 mg/ml) y se incubaron durante 24 h a 41 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la concentración de nitrito por la reacción de Griess (95). Brevemente, se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc MaxiSorp™), 50 µl de medio de cultivo junto con el mismo volumen de diluciones seriadas de NaNO₂ (125 µM - 1 M) que se utilizaron como curva estándar. Luego, se añadieron 50 µl de cada reactivo de Griess (sulfanilamida y naftiletilendiamina) y se midió la absorbancia a 530 nm en cada pocillo con un lector Multiskan (Thermo Scientific™). La concentración de NO₂ en cada muestra se determinó por extrapolación de la absorbancia a 530 nm en la curva estándar.

5.6. Coinfección con el virus de la Bronquitis infecciosa

Para los ensayos de coinfección se utilizaron animales de tres semanas de edad que fueron inoculados en dos instancias diferentes según la Tabla 4 con un intervalo de 7 días entre ambas. La cepa utilizada de IBV, fue debidamente caracterizada y se la nombró como AV1308, perteneciente al genotipo A argentino amplificada y titulada en huevos embrionados SPF (Instituto de Virología, INTA). Los animales de los grupos 2 y 4 se inocularon con 500 µl conteniendo $2,3 \times 10^7$ DICT₅₀ de IBDV cepa LZD, mientras que los animales de los grupos 1 y 3 recibieron el mismo volumen de PBS. La segunda inoculación de los animales de los grupos 3 y 4 consistió en 2×10^2 Dosis Infecciosa de pollo del IBV por vía intratraqueal en 500µl mientras que la de los grupos 1 y 2 fue con el mismo volumen de PBS.

	Primera inoculación	Segunda inoculación
Grupo 1	PBS	PBS
Grupo 2	IBDV	PBS
Grupo 3	PBS	IBV
Grupo 4	IBDV	IBV

Tabla 4: Grupos experimentales en el ensayo de coinfección IBDV-IBV. Las inoculaciones se realizaron con un intervalo de 5 días.

Siete días después de la segunda inoculación, los animales fueron sacrificados y se obtuvo un fragmento de aproximadamente 30 mg del riñón, el cual se mantuvo en solución estabilizadora de ARN (RNAlater Qiagen™) para la extracción de ARN y la posterior cuantificación de copias del genoma de IBV.

5.7. Cultivos celulares

5.7.1. FEP

Los cultivos de FEP los realiza el Servicio de Cultivo Celulares del Instituto de Virología (INTA, Castelar) a partir de huevos embrionados de diez días de desarrollo. Los mismos se mantienen en medio 199 (Gibco™) especialmente formulado para este cultivo, suplementado con antibiótico-antimicótico (Gibco™) y 5 % de Suero Fetal Bovino (Gibco™).

5.7.2. DT40

La línea de células DT40 deriva de células B de la bursa de pollo transformadas con el virus de la Leucosis Aviar (ALV). Esta línea celular crece en suspensión a 41°C. Se utiliza medio RPMI, suplementado con Glutamina (Glutamax, Gibco), antibióticos (Anti-Anti 100X Gibco™), B-Mercapto etanol 0,1 mM (Sigma™), 10 % Suero Fetal Bovino (Gibco™) y 1 % Suero de Pollo (Gibco™).

5.7.3. QM-7

La línea de células QM-7 deriva del fibrosarcoma QT6 aislado originalmente por Moscovi en el año 1989 (58) de un tumor que se desarrolló en un ave tratada con metilcolantreno, es susceptible a la infección con IBDV (13). Las células se replican como mioblastos en medio MEM-D, suplementado con antibióticos (Anti-Anti 100X Gibco™), antimicótico (Ciriach, Roche™) y 10 % de SFB.

5.8. Infecciones en cultivo celular

Para realizar las infecciones en cultivo celular, se utilizó virus de la cepa LZD de Laboratorios Inmuner, cuya semilla liofilizada se amplificó en fibroblastos de FEP, como se explicó más arriba.

Las infecciones de células QM-7, se realizaron en placas de 6 pocillos con un 70 % de confluencia. Se lavaron las células dos veces con medio RPMI sin suero y luego se agregó 1 ml de ese medio conteniendo 10^6 unidades infectivas del virus y se incubó una hora con agitación periódica (adsorción). Pasado ese tiempo, se agregaron 2 ml de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (10 %) y antibióticos.

Las infecciones en células DT-40 se realizaron en placas de 6 pocillos conteniendo 10^6 células cada uno. Se obtuvieron pellets de esa cantidad de células que se resuspendieron en 200 μ l que contenían 10^6 unidades infectivas del virus. Se adsorbió por una hora y se agregaron 2 ml de medio de cultivo en cada pocillo.

5.9. Análisis de la inducción de apoptosis

5.9.1. Análisis del ciclo celular por tinción con Ioduro de Propidio

A diversos tiempos post infección, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS y fijadas con etanol 70 %, incubándolas a -20 °C hasta su uso.

Luego, se lavó la suspensión de células fijadas y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se agregaron 5 μ l de la solución de Ioduro de Propidio (1 mg/ml), se incubaron 5 minutos en oscuridad y se analizó el patrón por citometría de flujo comparado con células predominantemente en estadio G1 o G2.

5.9.2. Expresión génica de Caspasa 3

Se extrajo ARN total de células infectadas con el método de TRIZOL (Invitrogen™) como se describió en el punto 5.3.1. Se incubó con DNAsa1 y se realizó la síntesis del ADNcopia como se detalló en el mismo ítem.

La cuantificación del mensajero total de este gen se realizó en comparación con la curva patrón del mismo modo que fue descrito en la sección 5.3.

5.9.3. Medición de la activación de Caspasa 3

Para analizar la activación proteica de la enzima Caspasa 3 se utilizó el kit EnzCheckCasp3 (Invitrogen™). El reactivo que provee este sistema es una proteína que, si es clivada específicamente por la Caspasa 3, emite fluorescencia a 441 nm.

Las células infectadas a distintos tiempos se cosecharon por triplicado y se lavaron dos veces con PBS. Luego se centrifugaron a 1500 rcf, se retiró el sobrenadante y el pellet celular se conservó a -80 °C hasta su uso.

El protocolo se realizó según las indicaciones del fabricante. El mismo consistió en la extracción proteica con una solución de lisis y dos pasos de congelado-descongelado para completar la lisis celular. Luego, se centrifugó a 10000 rcf, obteniéndose en el sobrenadante las proteínas celulares totales a las que se le agregó el reactivo nombrado anteriormente. Se incubó la reacción 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente y se analizó la emisión a 441 nm excitando a 341 nm con el fluorómetro Molecular Device Modelo SpectraMax Gemin EM.

5.10. Análisis de la localización subcelular de VP5

5.10.1. Análisis *in silico* de putativos dominios de transmembrana

Se utilizaron una variedad de predictores basados en diferentes métodos que definen si la proteína blanco posee o no un dominio de transmembrana a partir de su secuencia aminoacídica. Los mismos son de acceso público y se encuentran alojados en distintos servidores. Algunos de ellos, además, indican qué región estaría expuesta en el espacio extracelular.

Los programas utilizados fueron:

TMPreD (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) desarrollado por Hofman y colaboradores en el año 1992 (25).

OCTOPUS (<http://octopus.cbr.su.se/>) desarrollado por Viklund y colaboradores en el año 2008 (102).

DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) desarrollado por Cserzo y colaboradores en el año 1997 (9).

Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) desarrollado por Omasits y colaboradores en el año 2014 (68).

Split (<http://split4.pmfst.hr/split/4/>) desarrollado por Juretic y colaboradores en el año 2002 (35).

TopPred (<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>) desarrollado por Von Heijne y colaboradores en el año 1992 (103).

PRODIV-TMHMM (<http://www.health2api.com/?p=10208>) desarrollado por Viklund y colaboradores en el año 2004 (101).

TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/index.php?about=proprodiv>) desarrollado por Viklund y colaboradores en el año 2004 (101).

5.10.2. Construcción de Vectores (pYFP, pCFP, pYFP-VP5, pVP5-CFP y pCherry)

Las secuencias codificantes para eYFP, eCFP y Cherry fueron obtenidas de los plásmidos pEYFP y pECFP y pCHERRY (Clontech, E.E.U.U.), respectivamente, usando los sitios HindIII que poseen los mismos.

El gen de la proteína viral VP5 se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región codificante de la misma a partir de células infectadas, de las cuales se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNcopia. El gen de la proteína viral se amplificó con los siguientes *primers*:

VP5Fw: ATGGTCAGTAGAGATCAGAC

VP5Rv: TCAGGCTTCCTTGGA

El producto de PCR se insertó en el vector pGEM-T a partir de las A sobresalientes que deja la enzima polimerasa.

La identidad del inserto fue analizada a partir de la secuenciación (Servicio de Genotipificación y Secuencia, INTA, Castelar).

Los fragmentos codificantes de los genes de las proteínas fluorescentes y el de la proteína viral VP5 fueron insertados, utilizando enzimas de restricción, en el vector pCDNA3 cuyo sitio de clonado múltiple se encuentra río arriba de la secuencia del promotor eucariota de citomegalovirus (CMV). De ese modo se obtuvieron los vectores pYFP-VP5 (fusionado en N-terminal al gen de la proteína fluorescente amarilla), pVP5-CFP (fusionado en C-terminal al gen de la proteína fluorescente cian), pYFP (plásmido que porta, bajo promotor constitutivo, el gen de la proteína fluorescente amarilla), pCDNA Cherry (plásmido que porta, bajo promotor constitutivo, el gen de la proteína fluorescente roja) y pCFP (plásmido que porta, bajo promotor constitutivo el gen de la proteína fluorescente cian).

El plásmido pYFP-PrP fue gentilmente cedido por el Dr. Holger Lorenz (Universidad de Heidelberg, Alemania).

El plásmido pGP64-Cherry fue gentilmente cedido por la Dra. Andrea Peralta, Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar.

5.10.3. Transfecciones

Se sembraron 4×10^5 células QM-7 por pocillo, en placas de 8 pocillos especialmente diseñadas para observar células vivas al microscopio (Lab-Tek™). A las 24 horas, habiendo alcanzado una confluencia del 80 %, se realizó la transfección utilizando Lipofectamina (Invitrogen™). Previamente se pusieron a punto las condiciones en cuanto a cantidad de ADN plasmídico utilizado, la cantidad de Lipofectamina y el tiempo de incubación. El protocolo final consistió en el uso de 400 ng de ADN y el agregado de 5 μ l de Lipofectamina con 4 horas de incubación de la mezcla ADN-Lipofectamina.

Brevemente, se incubaron 15 μ l de medio MEM-D sin suero con 5 μ l de Lipofectamina durante 15 minutos y por otro lado se prepararon 20 μ l del mismo medio con 1 μ g de ADN. Pasado este tiempo, se mezclaron ambas soluciones y se le agregó 100 μ l de medio RPMI sin suero.

Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se les agregó la mezcla descrita anteriormente. Se incubaron 4 horas a 37 °C y se les agregó 100 ml medio suplementado con 20 % de suero. Luego de 16 horas, se utilizaron las células para los respectivos ensayos de localización.

Para el caso del análisis de expresión de Caspasa 3 en células transfectadas con pYFP-VP5, el procedimiento se realizó en placas de 6 pocillos con 10^6 células QM-7 en cada uno. Se mantuvieron los tiempos de incubación y se utilizaron 1 μ g de ADN y 12,5 μ l de Lipofectamina.

5.10.4. Observación de Fluorescencia en Células Vivas

Pasadas 16 horas de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo por PBS. Las células transfectadas se visualizaron en el microscopio confocal espectral láser Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) usando un 63x de objetivo (HCX PL APO CS 63.0 $\times$ UV 1.20 agua). Las líneas de 458 y 514 nm de Argón se utilizaron para la excitación de CFP y YFP respectivamente, y la de 543 nm de He-Ne se empleó para la excitación de Cherry.

La configuración de energía del microscopio, detectores de ganancia y velocidad de exploración se ajustaron para optimizar el contraste y la resolución para cada imagen individual. Las imágenes recogidas se analizaron utilizando el software LAS de Leica AF.

5.10.5. Colocalización en la membrana plasmática

5.10.5.1. Colocalización de VP5 con un colorante de membrana

Para corroborar la localización de la proteína en la membrana plasmática se utilizó el marcador de membrana CM-Dil-Texas Red (Life Technologies™) el cual mediante el tratamiento realizado tiñe la membrana plasmática de las células tratadas. Brevemente, las células QM- 7 se lavaron con PBS y se añadió en cada pocillo 100 μ l del colorante con una concentración final de 50 mg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de suero fetal bovino frío y las células se lavaron tres veces en medio de cultivo completo a temperatura ambiente antes de la observación en el microscopio confocal. La excitación del colorante se realiza del mismo modo que para la proteína fluorescente roja.

El ensayo se realizó sobre células previamente transfectadas con el plásmido pVP5-CFP y se observó la colocalización de ambas fluorescencias.

5.10.5.2. Colocalización de VP5 con una conocida proteína de transmembrana.

Se realizaron cotransfecciones con los plásmidos pYFP-VP5 y pGP64-Cherry (que da lugar a la expresión de una conocida proteína baculoviral de transmembrana, (72) y se observaron células que habían recibido y expresado ambos vectores utilizando la configuración para observar cada tipo de fluorescencia.

5.10.6. Permeabilización de las células cotransfectadas

Por otro lado se analizó si la proteína VP5 se encuentra unida a la membrana plasmática de la célula transfectada.

Para ello se cotransfectaron células QM-7 con los plásmidos pYFP-VP5 y pCherry. La proteína Cherry producto de la expresión del gen que porta el plásmido, tiene una disposición citoplasmática.

Se observaron, con el microscopio confocal, células que mostraban ambos tipos de fluorescencia y se mantuvieron en foco durante el agregado de 11 μ l de digitonina de concentración 0,5 mM (10X) en el pocillo para permeabilizar las células. Si la fluorescencia amarilla queda retenida en la membrana plasmática de la célula observada (mientras que la roja se dispersa indicando la correcta permeabilización de la misma) la proteína VP5 se encuentra unida a la membrana plasmática.

5.10.7. Ensayos de protección de la fluorescencia a la proteasa

Para analizar la topología de la proteína VP5 en la membrana plasmática, se realizaron ensayos de protección de la fluorescencia a proteasas (FPP por sus siglas en inglés) según el protocolo desarrollado por el grupo de Holger Lorenz de la Universidad de Heidelberg, Alemania (52). Brevemente, las células transfectadas con los plásmidos pYFP-VP5 o pVP5-CFP se trataron con proteinasa K (agregando 10 μ l de la solución 10X cuya concentración es 0,5 mg/ml), mientras fueron observadas en el microscopio confocal. La proteinasa K puede acceder a las proteínas fluorescentes que se encuentren del lado extracelular, degradándolas proteolíticamente y apagando así su fluorescencia. Esto no ocurre si la proteína fluorescente se encuentra del lado citoplasmático. Asimismo, al agregar digitonina (del mismo modo que en el punto 5.10.6.) la proteasa es capaz de acceder a la célula y degradar proteolíticamente a la proteína fluorescente que se encuentra del lado citoplasmático. De este modo, dado que la expresión de los plásmidos pYFP-VP5 y pVP5-CFP da como resultado proteínas fluorescentes fusionadas al extremo N-terminal y C-terminal de VP5 respectivamente, es posible determinar qué región de la proteína VP5 se encuentra del lado extracelular y qué región del lado intracelular.

El software utilizado permite filmar en tiempo real los experimentos de modo de analizar el efecto tanto de la digitonina como de la proteasa sobre las células transfectadas.

5.11. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student con el programa GraphPad Prism para determinar las diferencias entre las muestras provenientes de animales tratados respecto a los controles de cada tiempo y órgano o de las células tratadas y sin tratar. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

6. RESULTADOS

6.1. Primera parte

Respuesta inmune aviar a IBDV

La primera parte de este trabajo de Tesis consistió en el estudio de la respuesta inmune aviar a IBDV. Si bien la interacción IBDV-pollo ha sido estudiada y reportada, existen aspectos de la respuesta inmune que siguen requiriendo atención.

En este trabajo utilizamos el modelo “pollo”, el hospedador natural del virus. Realizamos experimentos con animales y analizamos la respuesta en distintos órganos a través de las citoquinas expresadas. Para esta parte debimos familiarizarnos con el modelo aviar el cual difiere, como se expresó en la sección Introducción, con los modelos mamíferos en varios aspectos. La oferta de reactivos específicos para pollos es limitada por lo que en algunos casos necesitamos desarrollar herramientas propias.

Por otra parte, estudiamos diferentes características de la infección viral en cultivos celulares primarios y en líneas celulares derivadas de aves.

Finalmente, analizamos la influencia de la inmunosupresión producida por IBDV en el desarrollo de una infección generada con otro patógeno viral, en este caso IBV.

6.1.1. Elección de las dosis de IBDV utilizadas

En el presente trabajo utilizamos una cepa intermedia de IBDV disponible como vacuna. El primer paso fue determinar si este virus es capaz de provocar en pollos libres de patógenos específicos (SPF) cambios asociados a la infección con IBDV ya descritos y, en caso positivo, qué dosis del virus los produce.

Para ello inoculamos pollos SPF de tres semanas de edad (período en el que exhiben, dado el grado de desarrollo de la bursa de Fabricio, mayor susceptibilidad al virus) por vía oral, la ruta de entrada natural de IBDV, con diferentes dosis de la cepa LZD. El rango de dosis seleccionado abarcó desde la dosis vacunal hasta diez veces la misma y analizamos parámetros descriptos en la bibliografía asociados a la infección con cepas altamente virulentas como la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias en la bursa de Fabricio y la infiltración de linfocitos T en este órgano (38, 78).

En la Figura 6 se observa que la expresión génica del INF γ e IL-6 (ambas citoquinas proinflamatorias) en la bursa de Fabricio responde de manera dosis-

dependiente a 5 días post inoculación (dpi). La dosis elegida fue $2,3 \times 10^7$ DICT₅₀ debido a que provoca una fuerte sobreexpresión de estas citoquinas en la bursa acompañada por la infiltración de linfocitos T en ese órgano (datos no mostrados).

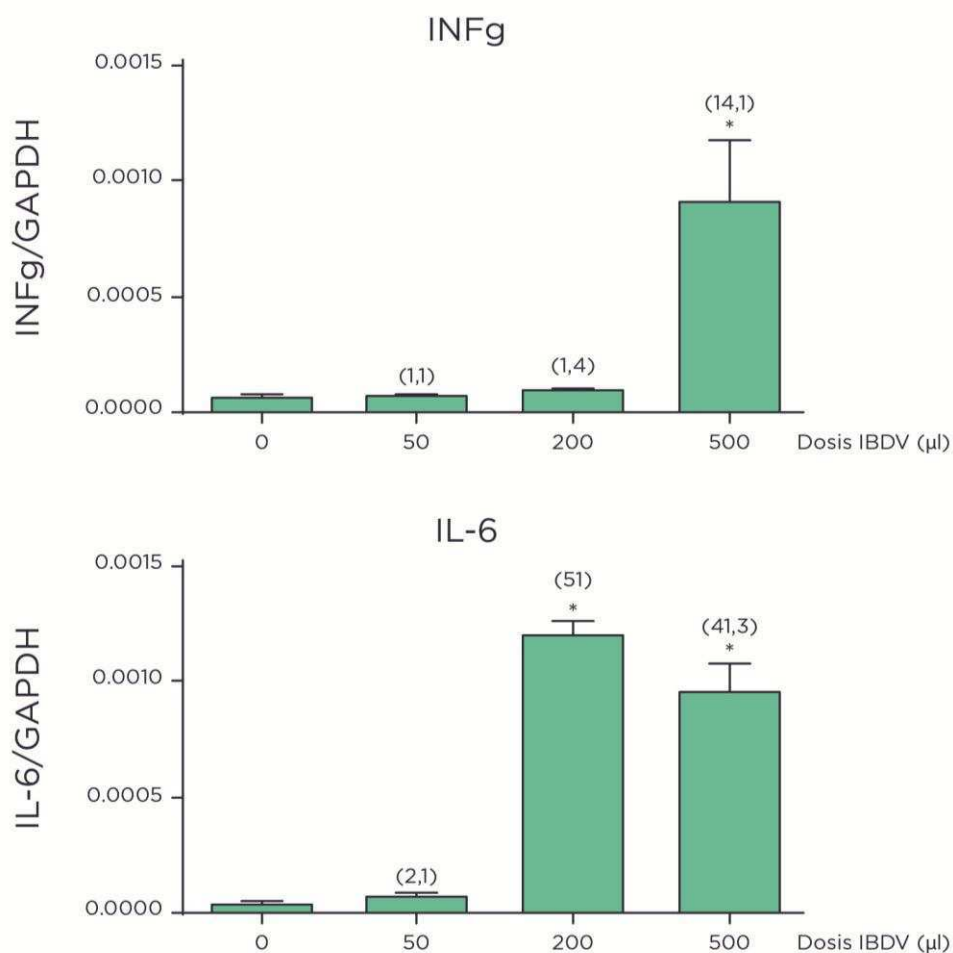


Figura 6: Análisis de la respuesta inmune de pollos SPF ante diferentes dosis de IBDV. Se inocularon pollos SPF de 3 semanas de edad con 50, 200 y 500 µl del stock viral de IBDV cuyo título es $4,6 \times 10^7$ DICT₅₀. A 5 dpi, los animales fueron sacrificados y se les extrajo la bursa de Fabricio de donde se purificó el ARN total, se retrotranscribió y se analizó, por PCR en tiempo real, la expresión de INFg e IL-6. Los animales control fueron inoculados con 500 µl de PBS. Se utilizaron cinco animales por grupo experimental y se realizaron pooles de ADNcopias de cada grupo. La figura muestra la relación de la cuantificación absoluta del gen de interés respecto a la del gen de expresión constitutiva GAPDH. Los números en la parte superior de cada barra representan las veces de sobreexpresión respecto al grupo control. (*) $p < 0,05$.

6.1.2. Análisis de la expresión de citoquinas en animales inoculados con IBDV por distintas vías

Entre las herramientas desarrolladas para estudiar la respuesta de pollos a IBDV se encuentra el ensayo de PCR en tiempo real. Esta metodología nos permitió medir cuantitativamente la expresión de diferentes citoquinas en los principales órganos de la respuesta inmune aviar.

Habiendo determinado las dosis de virus a inocular, abordamos el estudio de la respuesta que genera IBDV por la vía oral e intramuscular, ya que ambas son rutas utilizadas en la vacunación (OIE-Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2010, http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/a_index.htm).

Inoculamos pollos SPF con $2,3 \times 10^7$ DICT₅₀ de la cepa LZD de IBDV por vía oral o intramuscular. A 1, 3 y 5 dpi se sacrificaron cinco animales por grupo y se les extrajo el bazo, la bursa y el duodeno. A partir de un pequeño fragmento de cada órgano, se purificó el ARN total, se sintetizó el ADNcopia y se analizó la expresión de citoquinas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. El INF γ , una citoquina clave del perfil Th1 que, entre otras funciones, es capaz de activar macrófagos para producir factores inflamatorios tales como IL-6 e iNOS, se sobreexpresó principalmente en el bazo y la bursa a 3 dpi (10 a 23 veces), cuando el virus se inoculó por vía oral. Frente a la inoculación por vía intramuscular, se observó una sutil sobreexpresión (alrededor de 5 veces) en todos los tiempos estudiados en la bursa, a 3 y 5 dpi en el bazo y a 1 dpi principalmente en el duodeno.

La IL-15 se es responsable, entre otras funciones, de la activación de las células NK (45). La encontramos sobreexpresada en el bazo de los animales inoculados con IBDV por vía oral en el bazo a 1 y 3 dpi y en el duodeno a 5 dpi. En cambio, al inocular el virus por vía intramuscular vimos a esta citoquina subexpresada en el duodeno a 1 y 5 dpi y sutilmente sobreexpresada en la bursa a los 5 dpi.

Al mismo tiempo, la administración oral de IBDV indujo una leve sobreexpresión de la citoquina proinflamatoria IL-6 en el bazo a 1, 3 y 5 dpi y en el duodeno a 3 dpi. Asimismo, una sobreexpresión muy fuerte (200 veces) de ésta se observó en la bursa a 3 dpi. Este aspecto es una característica típica de la infección con IBDV y se observa además, cuando se inoculan animales con cepas de mayor virulencia (78). La inoculación intramuscular, en cambio, indujo un aumento en la expresión de dicha citoquina pero en bazo y un día después de la inoculación del virus.

La quemoquina IL-8, que actúa como señal química para atraer heterófilos al sitio

de la inflamación, acompañó la fuerte regulación de IL-6 e INF γ en la bursa a los 3 dpi en los animales que recibieron el virus por vía oral. En cambio, cuando el virus fue administrado por vía intramuscular, sólo observamos una sutil sobreexpresión de esta citoquina en duodeno a 1 y 3 dpi y en bursa a 1 dpi (Figura 7).

El LITAF es un factor de transcripción cuya función es, presumiblemente, inducir la expresión génica del ortólogo de TNF α que aún no ha sido caracterizado en pollos (26). Se observó una sobreexpresión de LITAF de 10 veces sólo en la bursa de los animales tratados con IBDV por vía oral a 5 dpi. En cambio, el virus inoculado por vía sistémica provocó un aumento del ARN mensajero de este factor de alrededor de 20 veces en el duodeno a 3 dpi (Figura 7).

El INF α es una citoquina antiviral fundamental. Otros autores no la han encontrado sobreexpresada, incluso la han hallado subexpresada en pollos tratados con cepas virulentas y altamente virulentas de IBDV (74). Curiosamente, nosotros la encontramos sobreexpresada en el duodeno y la bursa a 1 y 3 dpi, cuando el virus es inoculado por vía oral y en el duodeno de los animales que recibieron IBDV en forma sistémica.

En general, se observó que en respuesta a la inoculación por vía oral, las modificaciones más fuertes en la producción de citoquinas ocurren en la bursa de Fabricio, lo que podría atribuirse a que esa es la ruta de entrada natural del virus y por ello le permite llegar al órgano blanco con más facilidad.

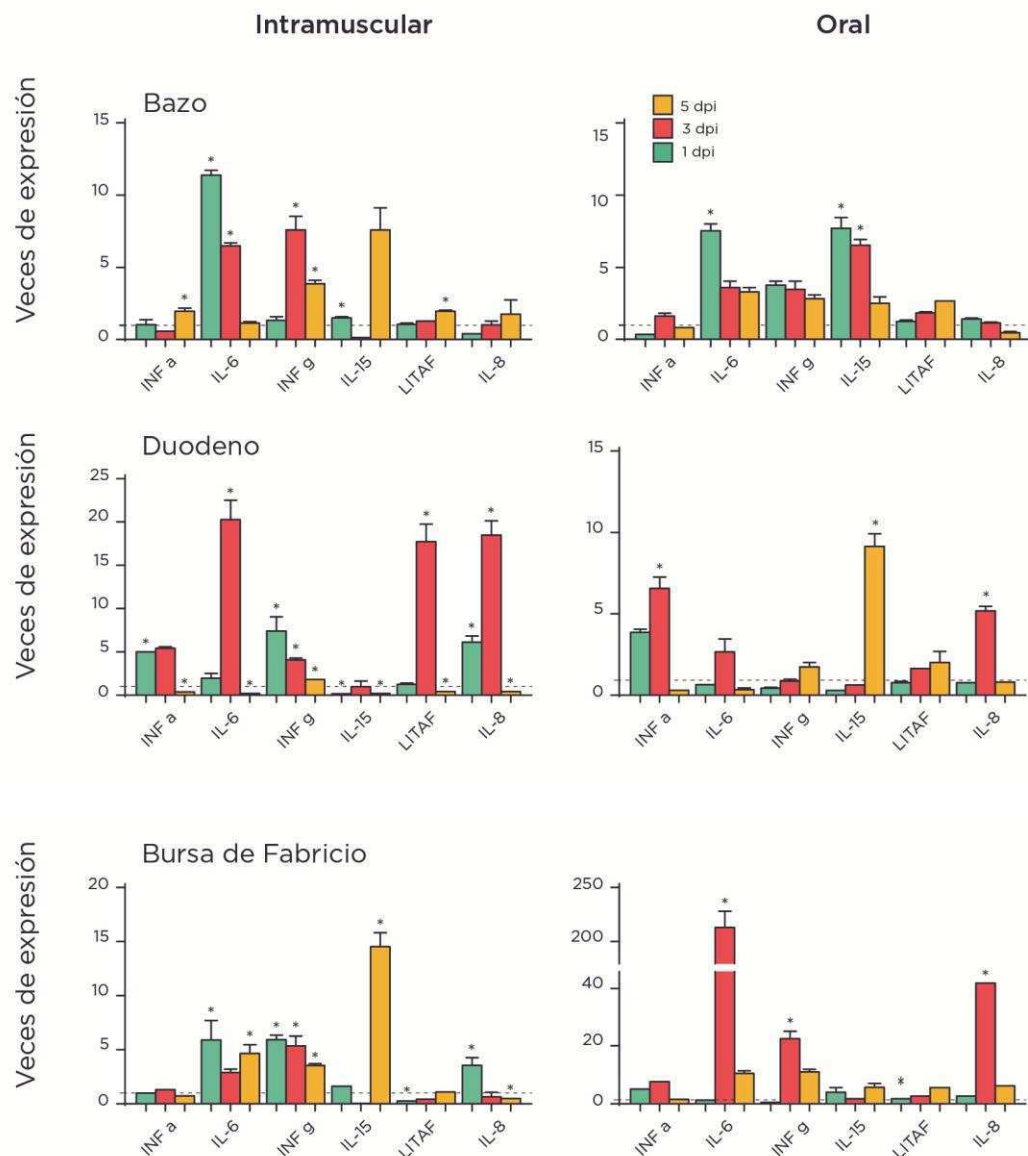


Figura 7: Expresión de citoquinas en bazo, duodeno y bursa de Fabricio a 1, 3 y 5 dpi. La figura muestra el número de veces de expresión de cada citoquina en el órgano correspondiente. Para obtener este valor se realizó la cuantificación absoluta de cada citoquina y del gen de expresión constitutiva GAPDH. El valor obtenido de cada citoquina en los animales inoculados a 1, 3 y 5 dpi se dividió, a su vez, por el valor obtenido de cada tiempo (también normalizado por GAPDH) de los animales control. El valor obtenido se graficó. (*) $p < 0,05$. Los resultados de la izquierda corresponden al experimento con animales inoculados por vía intramuscular; los de la derecha, a los animales inoculados por vía oral.

6.1.3. Análisis de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta a IBDV

La infección con cepas virulentas y altamente virulentas de IBDV provoca cambios en la proporción de poblaciones celulares inmunocompetentes en distintos órganos (38). Por lo tanto, decidimos analizar si la cepa estudiada (de virulencia

intermedia) es capaz de inducir estos cambios.

Para ello, a los pollos SPF inoculados por las vías estudiadas con $2,3 \times 10^7$ DICT₅₀ de la cepa LZD de IBDV, se les extrajo la bursa a los 5 dpi y se analizaron las poblaciones celulares involucradas por citometría de flujo, utilizando diferentes combinaciones de anticuerpos descritas en la sección Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la Tabla 5. Se puede observar un fuerte incremento de la proporción de linfocitos T totales (CD3+) y de CD4+ y CD8+, tanto cuando el virus es inoculado por vía intramuscular como por vía oral.

	CD3+ CD4+	CD3+ CD8 $\alpha\beta$ +	CD3- CD8 α +
Oral	9,6	26,8	4,1
Intramuscular	7,7	22	18

Tabla 5: Análisis de las poblaciones linfocitarias en la bursa de Fabricio. Los valores de la tabla representan el número de veces de incremento de las poblaciones estudiadas en los animales tratados con IBDV respecto a los animales control. Se muestran datos de tres experimentos independientes.

6.1.4. Inmunosupresión

6.1.4.a. Análisis de la activación de esplenocitos de aves inoculadas con IBDV

Otro aspecto que analizamos fue la capacidad de las células provenientes del bazo, tanto de animales inoculados por ambas vías como de animales control, de responder a la estimulación con Concanavalina A (ConA). Este compuesto constituye un mitógeno originalmente extraído de *Canavalia ensiformis*, una legumbre que provoca la activación inespecífica de una amplia gama de células del sistema inmune, en particular de linfocitos T que, al activarse, secretan INF γ , citoquina capaz de activar a los macrófagos (104). Se evaluó la expresión de nitrito (NO₂) en estas células a través de la reacción de Greiss; el NO₂ se considera un marcador de macrófagos activados. Esta especie reactiva de oxígeno se genera en respuesta a estímulos externos a fin de neutralizar potenciales agentes patógenos (6).

Los esplenocitos que provenían de animales inoculados por vía intramuscular, mostraron un aumento en la expresión de NO₂ a 1 dpi (tanto estimulados como no estimulados con ConA). En cambio, a 3 y 5 dpi estas células mostraron menor capacidad de respuesta al estímulo, lo que podría deberse al efecto

inmunosupresor de IBDV.

Por otro lado, las células provenientes del bazo de animales inoculados con IBDV pero por vía oral mostraron mayor expresión de NO_2 a 1 y 3 dpi, en el último caso sólo si eran, además, estimuladas con ConA (Figura 8).

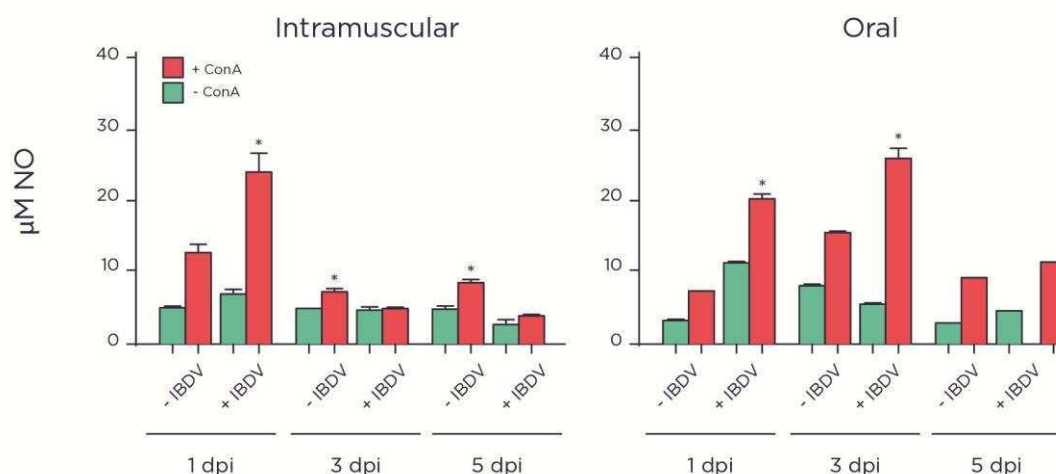


Figura 8: Concentración de NO_2 en esplenocitos. Esplenocitos obtenidos de animales inoculados con IBDV (o PBS) por vía oral o intramuscular se aislaron a partir de los bazos extraídos a 1, 3 y 5 dpi. Se aislaron las células mononucleares por gradiente de densidad, se lavaron y contaron y se sembraron 2×10^6 células viables por pocillo en placas de 96 pocillos por triplicado en presencia (o ausencia) de 5 mg/ml de ConA (barras verdes y rojas respectivamente). Las células fueron incubadas por 24 h a 41 °C, se cosechó el sobrenadante y se midieron las concentraciones de NO_2 con el reactivo de Griess. Cada barra representa la media $\pm$ SEM de 3 repeticiones de cada grupo. (*) $p < 0,05$.

6.1.4.b. Coinfección con otros patógenos

Otro agente infeccioso de alta relevancia en la industria avícola es el Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), perteneciente a la familia *Coronaviridae*, que provoca una enfermedad contagiosa que se caracteriza fundamentalmente por trastornos respiratorios (Manual OIE, IBV http://oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf).

En los primeros meses del año 2013 se registró un incremento significativo de casos de bronquitis en pollos parrilleros en granjas de la provincia de Entre Ríos. Pudieron aislarse dos cepas de IBV, que fueron debidamente caracterizadas y se las nombró como AV1308 y AV1314: ambas pertenecientes al genotipo A argentino. Llamativamente, luego de amplificar exitosamente los virus de ambas cepas en huevos SPF, se observó que no causaban, en animales de experimentación, ningún

signo clínico compatible con la enfermedad (Dr. Ariel Vagnozzi, comunicación personal).

Para comprobar si esta diferencia de comportamiento de las cepas de IBV a campo y en el laboratorio podía estar relacionada con la presencia de agentes inmunosupresores que habitualmente se encuentran en las granjas de cría intensiva, decidimos analizar si la inmunosupresión que causa IBDV en nuestro modelo, podría tener algún efecto en la coinfección con IBV.

Utilizamos 20 pollos de tres semanas de edad que se dividieron en cuatro grupos. Los animales del grupo 1, control, fueron inoculados con solución salina y 7 días después, nuevamente con solución salina por vía intratraqueal. A las aves del grupo 2 se las inoculó por vía oral con la dosis de IBDV descrita en el punto 6.1. y a 7 dpi se les suministró PBS por vía intratraqueal. El grupo 3 fue inoculado sólo con IBV y el grupo 4 se inoculó con IBDV y, a los 7 dpi, con IBV (Tabla 4). La cepa utilizada fue AV1308, mencionada anteriormente. Siete días luego de la segunda inoculación, los animales fueron sacrificados. Se obtuvieron los riñones para extraer ARN y, luego de la retrotranscripción, se analizó por PCR en tiempo real la presencia de genoma de IBV. Los signos nefropatológicos que se observan cuando las aves son infectadas con las cepas de alta virulencia de IBV se relacionan con la replicación viral en este órgano. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. Como se puede observar, en los riñones de los animales de los grupos 1 y 2 no detectamos genoma de IBV. El grupo 3 mostró niveles apenas detectables de genoma, mientras que el grupo 4 reveló niveles notablemente superiores a los del grupo 3 comprobando que la cepa de IBV utilizada es capaz de replicar en riñón, y que la actividad replicativa aumenta en presencia de IBDV. Estos resultados indican que la infección previa con IBDV aumenta la replicación del IBV en el riñón demostrando a nivel funcional la inmunosupresión que causa en nuestro modelo con IBDV y aportando indicios de las posibles causas de los signos clínicos compatibles con IBV que se observaron durante 2013 en las granjas de producción.

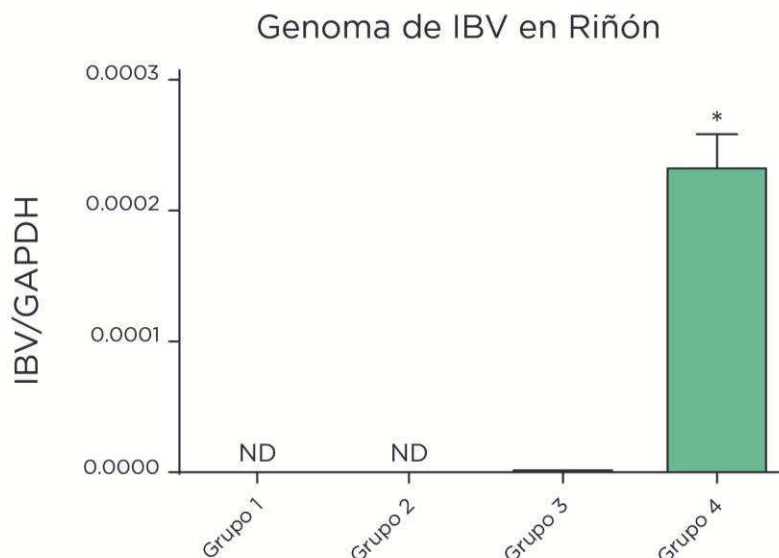


Figura 9: Coinfección de IBDV e IBV. Pollos de tres semanas de edad fueron inoculados y a 5 dpi coinfectados según los grupos: Grupo 1: PBS/PBS; Grupo 2: IBDV/PBS; Grupo 3: PBS/IBV; Grupo 4: IBDV/IBV. Siete días después de la segunda inoculación, los animales fueron sacrificados y se obtuvo de cada uno ARN de riñón que fue retrotranscripto y analizado por PCR en tiempo real. Se utilizaron pools de de ADNcopia de los cinco animales del grupo para cuantificar la presencia del genoma de IBV. La figura muestra la cuantificación absoluta del número de copias del genoma del virus normalizada por la cuantificación absoluta del número de copias del ARN mensajero de GAPDH utilizado como gen de referencia. (*) $p < 0,05$.

6.1.5. Inducción de apoptosis

Dado que existen datos controversiales en la bibliografía acerca del rol que cumple IBDV en la apoptosis y en particular la proteína VP5, abordamos el análisis de este fenómeno a través de distintos parámetros. Los experimentos se realizaron en la línea celular QM-7 que proviene de mioblastos de codorniz y en la línea celular DT-40 derivada linfocitos B de pollo.

Analizamos el estado de fragmentación del genoma celular por tinción con Ioduro de propidio, la expresión génica de Caspasa 3 (cisteín proteasa efectora de la apoptosis) por PCR en tiempo real y la activación de ésta utilizando un kit comercial.

6.1.5.a. Análisis del estadio celular por tinción con Ioduro de Propidio

El Ioduro de propidio es un agente intercalante del ADN. Gracias a su fluorescencia es posible analizar, por citometría de flujo, el contenido de ácidos nucleicos que posee cada célula. De este modo, se puede determinar la proporción de células que se encuentran en los estadios G0/G1 o G2/M. Por su parte, las células que

están en fases avanzadas de la apoptosis, es decir cuando su ADN ya se ha fragmentado, muestran menor cantidad de ácidos nucleicos por célula dado que la fijación por metanol induce poros en las membranas celulares dando lugar a la pérdida de los fragmentos más pequeños y en consecuencia es posible diferenciarlas del resto dado que emiten menos fluorescencia, observándose células con menor contenido de ADN ubicadas previas al pico G0/G1 (región sub-G1).

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos en células QM-7. A 24 horas post infección, se observa un 30 % de las células infectadas en la región sub-G1, mientras que en las células control ese valor ronda el 4 %. Este resultado se mantiene a las 28 horas post infección indicando que IBDV induciría apoptosis en este tipo celular.

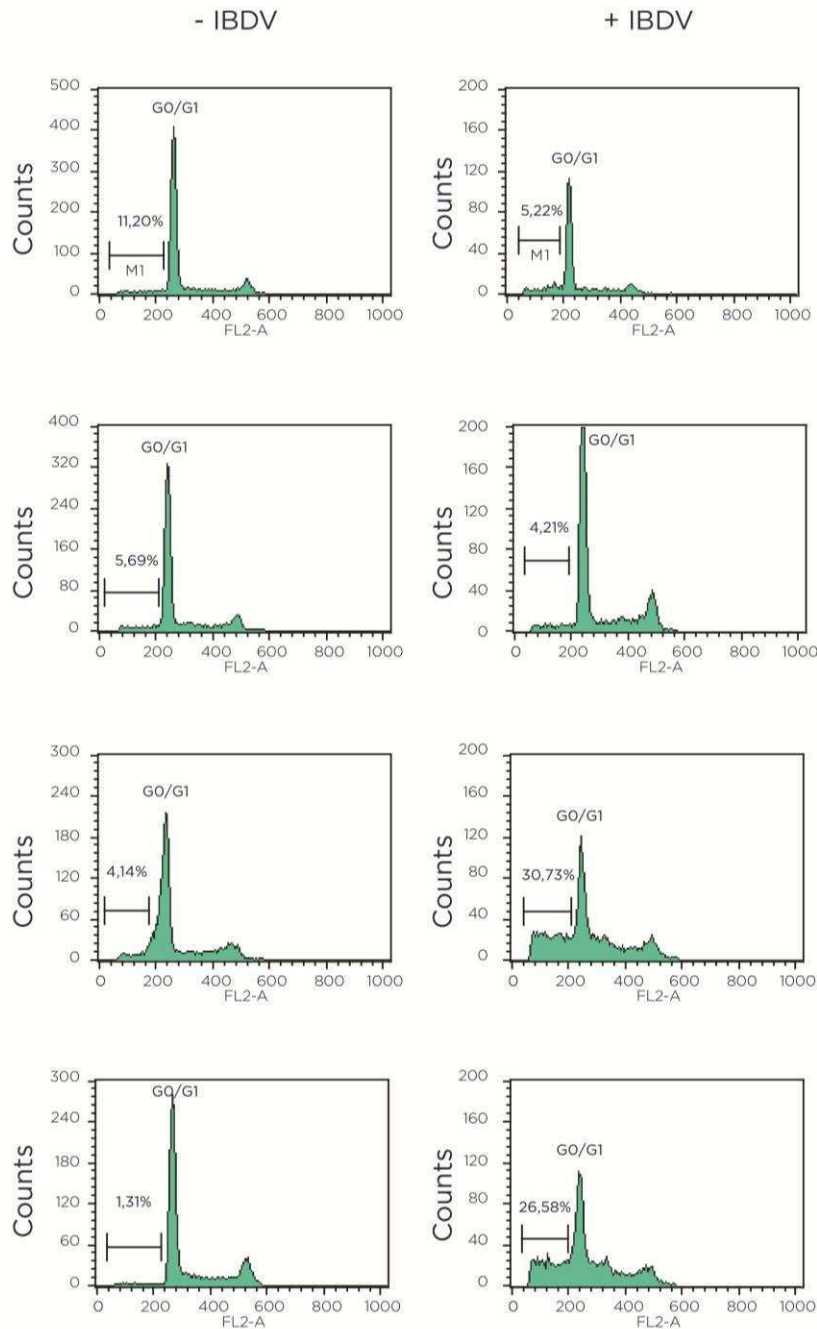


Figura 10: Análisis del estadio celular por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo de células QM-7 infectadas con IBDV. Se muestra la cantidad de células (cuentas) en función de la cantidad de fluorescencia en unidades arbitrarias. El pico de fluorescencia corresponde a las células que están en estadio G0/G1. Se muestra el porcentaje de células con diferente nivel de degradación de su genoma. Se observan células infectadas (o no infectadas) a las 2, 3, 16, 24 y 28 horas post infección. A las 24 horas post infección, se observa cómo han aumentado los eventos en esta región mientras que en las células control se sigue observando un patrón similar en todos los tiempos analizados.

Por otro lado, analizamos por este método el contenido de ADN de células QM-7 transfectadas con el gen de la proteína viral VP5 fusionada a la proteína fluorescente amarilla YFP (y sus respectivos controles). En este caso no se observaron cambios. Además analizamos el estadio celular en células DT-40. Estas son linfocitos B que provienen de un linfoma de bursa, por lo que se trata de un modelo más cercano al blanco natural de IBDV.

Tanto en el caso de las células transfectadas como en los linfocitos no observamos diferencias en la tinción del genoma con Ioduro de Propidio (datos no mostrados).

6.1.5.b. Análisis de la activación de Caspasa 3

La Caspasa 3 es una proteína clave en la apoptosis ya que, al ser activada, se convierte en efectora de este proceso independientemente de si la apoptosis ocurre por vía intrínseca o extrínseca (93).

Las células DT-40 no muestran efecto citopático cuando son infectadas con IBDV aunque el virus replica en ellas (12) y no mostraron diferencias en la tinción de genoma con Ioduro de Propidio.

Para continuar el análisis de la capacidad del virus para inducir o inhibir la apoptosis, infectamos células DT-40 y QM-7 con una multiplicidad de infección de 1 con la cepa LZD, utilizada a lo largo del presente trabajo.

Estudiamos, a diferentes tiempos, la activación de la cisteína proteasa efectora de la apoptosis.

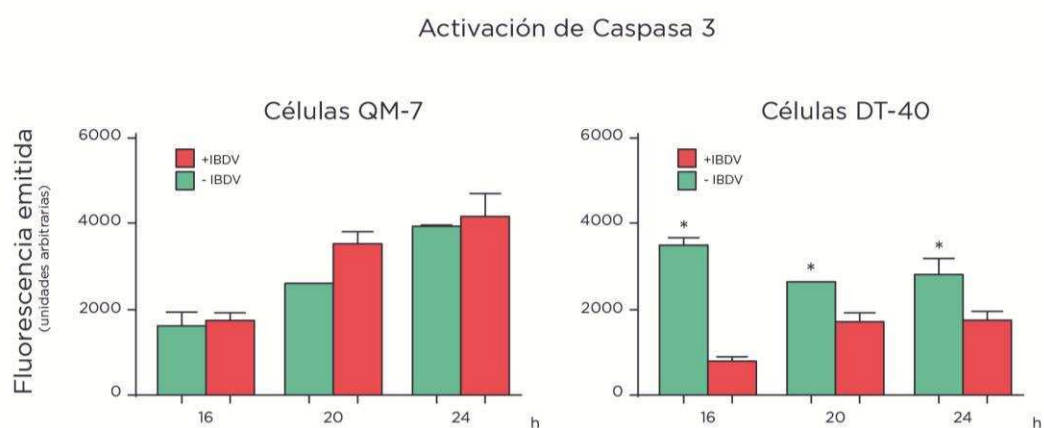


Figura 11: Análisis de la activación de la proteína Caspasa 3 en células QM-7 y DT-40. Se extrajeron proteínas totales de células QM-7 y DT-40 infectadas con IBDV y se analizaron los extractos utilizando el kit EnzymeCheckCasp3. La figura muestra la fluorescencia emitida por células infectadas con una MI de 1 y

cosechadas a los tiempos indicados. Las barras rojas corresponden a células infectadas, mientras que las verdes, a células control. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. () $p < 0,05$.*

En la figura 11 podemos observar que a las 20 horas post infección el virus es capaz de estimular mecanismos apoptóticos que desembocan en la activación de la Caspasa 3 en células QM-7, aunque este efecto es sutil ($p=0,1$) y no se observa en los otros tiempos analizados.

Llamativamente, al analizar este efecto en las células DT-40, derivadas de linfocitos B blancos naturales del IBDV, se observa una fuerte disminución de la activación de Caspasa 3 en las células infectadas. Este resultado podría explicar en parte el hecho de que no se observa efecto citopático ni fragmentación del genoma al infectar estas células con IBDV.

6.1.5.c. Análisis de la expresión génica de Caspasa 3

Dado que existen casos de virus de diferentes familias que son capaces de alterar la expresión de Caspasa 3 a nivel de su expresión génica (11, 40) y por lo observado en los ensayos anteriores, intentamos analizar si el IBDV posee esta particularidad.

Nuevamente, elegimos el método de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de Caspasa 3. La descripción de esta puesta a punto se encuentra en la sección “Materiales y Métodos”.

El estudio de la expresión génica de Caspasa 3 lo realizamos en células QM-7 infectadas con IBDV y transfectadas con VP5 fusionada a una proteína fluorescente bajo un promotor de expresión constitutiva y los respectivos controles (su construcción está descrita en la sección Materiales y Métodos).

A las 24 horas se extrajo el ARN total de células QM-7 infectadas con IBDV o transfectadas con pYFP-VP5 y se cuantificó el ARN mensajero de Caspasa 3 por PCR en tiempo real (Figura 12).

Observamos que, al tiempo analizado, el ARN mensajero de Caspasa 3 se vio incrementado en las células infectadas respecto al control. Llamativamente, en las células que expresaban la proteína VP5, el mensajero de Caspasa 3 se encontraba reducido.

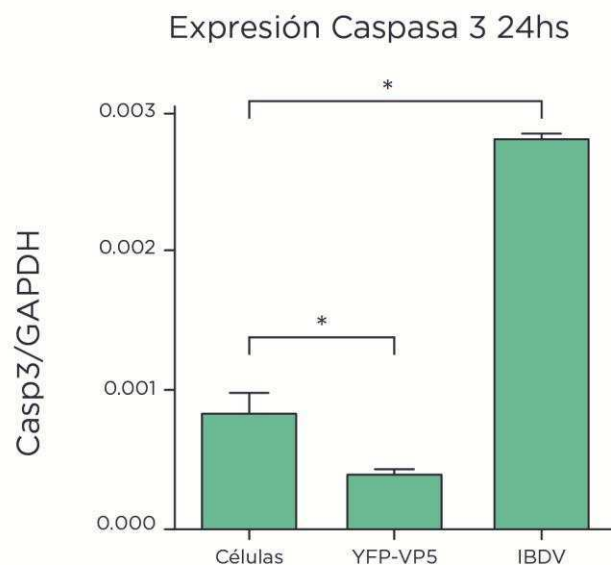


Figura 12: Expresión génica de Caspasa 3. Se extrajo ARN total de células QM-7 infectadas con IBDV (multiplicidad de infección=1) o transfectadas con el gen de la proteína VP5 fusionado al gen de la proteína fluorescente YFP a las 24 horas post infección y post transfección y células control. Se realizó la síntesis de ADNcopia y se midió por PCR en tiempo real la cantidad absoluta de ARN mensajero de Caspasa 3 y del gen de expresión constitutiva GAPDH en muestras obtenidas por triplicado de cada tratamiento. La figura muestra la relación de ambos mensajeros y es representativa de tres experimentos independientes. La eficiencia de transfección fue de alrededor del 40 %. (*) $p < 0,05$.

Lamentablemente, las células DT-40, al crecer en suspensión, resultan difíciles de transfectar y no logramos hacerlo con niveles de eficiencia adecuados para este tipo de análisis.

6.2. Segunda parte

Análisis de la localización subcelular de la proteína VP5

En la segunda parte del presente trabajo de Tesis nos enfocamos en el estudio de la localización subcelular de la proteína viral VP5. Como se detalló anteriormente, la misma posee un rol controversial según está descrito en la bibliografía. Respecto a su localización, mediante el uso de métodos bioinformáticos está definida como una proteína de transmembrana que expone hacia el espacio extracelular su dominio C-terminal (51). Sin embargo, otros trabajos la han descrito en otros compartimentos celulares (44, 105, 109). En esta sección, ponemos a prueba lo anteriormente expresado, utilizando mayor cantidad de predictores bioinformáticos y estudios de *Imaging* con células vivas.

6.2.1. Dominios de transmembrana de VP5 predichos *in silico*

En el año 2000, Lombardo y colaboradores analizaron por primera vez la localización subcelular de VP5 utilizando métodos bioinformáticos (51). Los autores, aplicando el programa TMPred (que se detalla más abajo), determinaron que VP5 es una proteína de transmembrana cuyo dominio carboxi-terminal se encuentra orientado hacia el espacio intracelular. En ese trabajo utilizaron la proteína VP5 amplificada de la cepa Soroa de IBDV, la cual fue aislada en Cuba y es patogénica (50). Al correr en ese mismo programa la secuencia aminoacídica de VP5 de la cepa de virulencia intermedia que utilizamos en el presente trabajo se obtuvieron resultados similares (Figura 13).

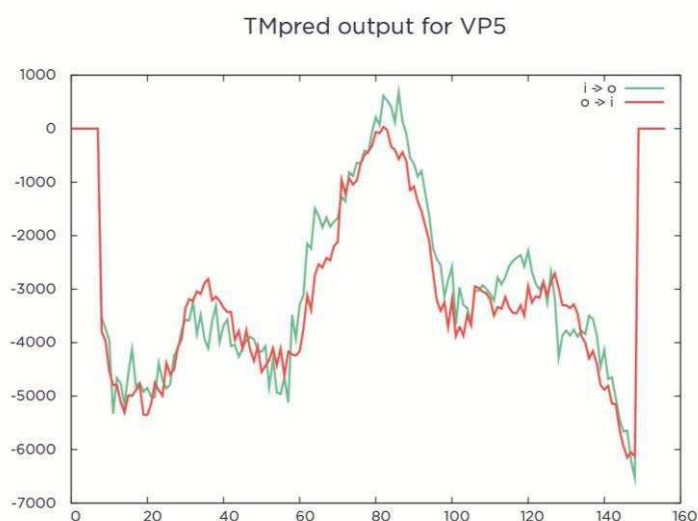


Figura 13: Análisis *in silico* de la proteína VP5. En el gráfico se muestra el índice de hidrofobicidad en función del número de residuo de la proteína analizada. Se observa una putativa región de transmembrana hacia el aminoácido 70. Los resultados son similares a los obtenidos por Lombardo y colaboradores en su trabajo del año 2000 (51).

Para corroborar este resultado se realizaron múltiples predicciones. Utilizamos diferentes predictores disponibles que, según distintos algoritmos, asignan o no un dominio de transmembrana a la proteína blanco. A su vez, algunos de éstos señalan qué región de la proteína se encuentra hacia el interior de la célula.

El algoritmo del predictor Tmpred se basa fundamentalmente en la comparación de dominios transmembrana que poseen proteínas que se encuentran anotadas en la base de datos suiza Swiss-Prot. Esta base de datos tiene la particularidad de almacenar datos de proteínas con alto nivel de anotación que incluyen estructura,

función y modificaciones postraduccionales. Octopus, en cambio, se basa en la comparación con métodos estadísticos de 124 proteínas de estructura conocida para determinar dominios de transmembrana en la proteína blanco. A su vez, DAS utiliza un método gráfico de baja rigurosidad basado en matrices de comparación con una colección de proteínas de transmembrana no homólogas. Protter compara las regiones de la proteína analizada con las bases de datos de dominios de transmembrana UniProt y Phobius. El programa SPLIT, en cambio, para asignar dominios de transmembrana busca los residuos aminoacídicos que se encuentran conservados en gran cantidad de proteínas en las regiones inmediatas a éste. TopPred busca estructuras de alfa hélice flanqueadas por residuos cargados para adjudicar el dominio de transmembrana. PRODIV-TMHMM hace especial énfasis en la topología comparando, como lo hacen otros programas, con bases de datos curadas de proteínas. Por último, TOPCONS utiliza varios servidores diferentes para asignarle un consenso a la proteína estudiada (Tabla 6).

Predictor	Resultado Soroa	Resultado LZD	Ref.
TMpred	Dominio de transmembrana. El extremo N-terminal hacia el interior de la célula.	Dominio de transmembrana. El extremo N-terminal hacia el interior de la célula.	(25)
Octopus	Sin dominio de transmembrana.	Sin dominio de transmembrana.	(102)
DAS	Dominio de transmembrana.	Dominio de transmembrana.	(9)
Protter	Sin dominio de transmembrana.	Sin dominio de transmembrana.	(68)
Split	Dominio de transmembrana.	Dominio de transmembrana	(35)
TopPred	Dominio de transmembrana.	Dominio de transmembrana.	(103)
PRODIV-TMHMM	Dominio de transmembrana. El extremo N-terminal hacia el interior	Dominio de transmembrana. El extremo N-terminal hacia	(101)

	de la célula.	el interior de la célula.	
TOPCONS	Sin dominio de transmembrana.	Sin dominio de transmembrana.	(101)

Tabla 6: Análisis de VP5 in silico. Predictores de acceso público fueron corridos con la secuencia de aminoácidos de VP5 de la cepa virulenta Soroa (la cual se usó en el trabajo de Lombardo y colaboradores del año 2000 (51)) y de la cepa LZD utilizada en el presente trabajo de tesis para determinar si se trata o no de una proteína de transmembrana.

Se puede observar que, aunque la mayor parte de los predictores señala a VP5 como una proteína de transmembrana, otros la indican como una proteína sin esta particularidad.

Entre los programas que descartan el dominio de transmembrana está TOPCONS que, como se detalló más arriba, es un consenso de varios programas.

Por lo tanto, no es posible determinar a través de métodos bioinformáticos, si VP5 es o no una proteína de transmembrana.

A pesar de que la cepa que utilizamos en el presente trabajo es de virulencia intermedia y la utilizada por Lombardo y colaboradores en el año 2000 es altamente virulenta no se observan cambios en la localización predicha con ningún servidor.

6.2.2. Localización de la proteína VP5

Para realizar los experimentos de localización de VP5 se construyeron genes quiméricos en donde el gen que codifica para la proteína VP5 se fusionó en sus extremos amino y carboxi terminal a la proteína fluorescente amarilla y a la proteína fluorescente cian (YFP y CFP por sus siglas en inglés) respectivamente.

En primer lugar realizamos transfecciones de células QM-7 con las fusiones mencionadas. Veinticuatro horas post transfección, las células fueron analizadas mediante microscopía confocal para observar la localización celular de la proteína de interés.

En la Figura 14 se observa que VP5 se localiza, preponderantemente, en la membrana plasmática de las células QM-7 dado que se observa la fluorescencia en esa posición en las células transfectadas tanto en el caso de la fusión en N-terminal (fluorescencia amarilla, transfectadas con pYFP-VP5) como en C-terminal (fluorescencia cian, transfectadas con pVP5-CFP). Por otra parte, las células

transfectadas tanto con el gen de la proteína YFP (pYFP) como con el de la proteína CFP (pCFP) sin fusión muestran una localización citoplasmática.

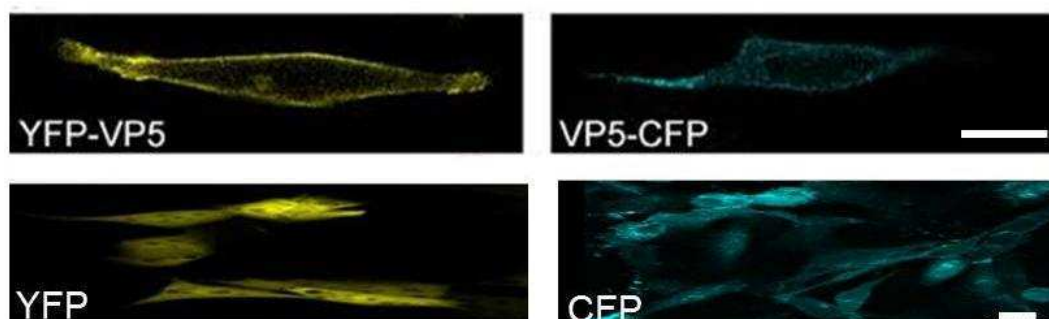


Figura 14: Localización de la proteína viral VP5. Se transfectaron células QM-7 con los plásmidos pVP5-CFP y pYFP-VP5 (panel superior) y con pYFP y pCFP (panel inferior). Veinticuatro horas post transfección se observaron por microscopía confocal como se describe en la sección Materiales y Métodos. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

6.2.3. Colocalización de las fusiones con un marcador de membrana plasmática y una proteína conocida de membrana

Para confirmar la localización de VP5 en la membrana plasmática, las células fueron transfectadas con el plásmido pVP5-CFP y, veinticuatro horas después, se las tiñó con un marcador de membrana que emite fluorescencia roja llamado CM-Dil para luego observar la colocalización con el color que aporta la proteína fluorescente cian. En la Figura 15 se observa una colocalización de ambos colores en la membrana plasmática de las células transfectadas.



Figura 15: Colocalización de VP5 con un marcador de membrana. Se transfectaron células QM-7 con pVP5-CFP y 24 horas post transfección se tiñeron con el marcador de membrana CM-Dil según instrucciones del fabricante. Inmediatamente se observaron en el microscopio confocal. Se observa la colocalización de la fluorescencia de ambos marcadores. La imagen es

representativa de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

Por otra parte, realizamos cotransfecciones con cada una de las fusiones descritas y el gen de la proteína GP64 de Baculovirus fusionado al de la proteína fluorescente roja mCherry (pGP64-Cherry). GP64 es una conocida proteína viral que se localiza en la membrana plasmática de las células que la expresan (72). En la Figura 16 se observa la colocalización de ambas fusiones de VP5 (YFP-VP5 y VP5-CFP) con GP64-mCherry en la membrana plasmática de las células estudiadas.

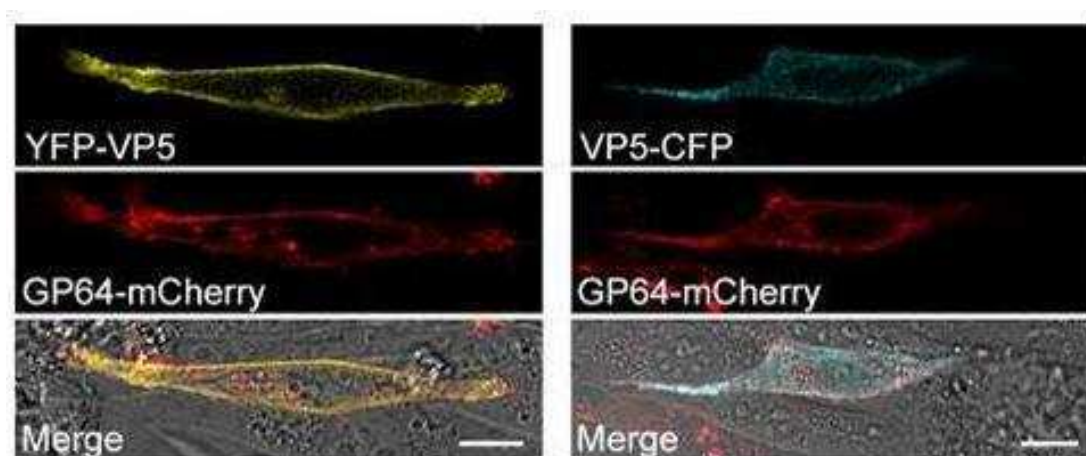


Figura 16: Colocalización de VP5 con una conocida proteína de membrana. Se cotransfectaron células QM-7 con los plásmidos pYFP-VP5 o pVP5-CFP y pGP64-mCherry. Las células cotransfectadas fueron observadas 24 horas post transfección. Se observa la colocalización de la fluorescencia amarilla y cian con la fluorescencia roja. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

6.2.4. La proteína VP5, ¿está asociada a la membrana plasmática?

Otro aspecto a tener en cuenta acerca de la localización de VP5 en la membrana plasmática es el grado de asociación entre la proteína y la membrana. Para abordar esta cuestión sometimos células QM-7 transfectadas con los diferentes plásmidos al tratamiento con digitonina, que crea poros en la membrana plasmática.

En primer lugar se cotransfectaron células QM-7 con los plásmidos pYFP-VP5 y pCherry (que posee el gen de la proteína fluorescente roja bajo promotor constitutivo). Veinticuatro horas post transfección se observaron las células en el microscopio confocal a fin de detectar células que se hubieran transfectado con ambas construcciones. Una vez enfocadas, se les agregó digitonina y se filmó el campo óptico en tiempo real.

La Figura 17 muestra capturas tomadas de esa filmación en las que se puede

observar cómo, al agregar digitonina, la fluorescencia roja citoplasmática se disipa mientras que la fluorescencia amarilla que corresponde a la fusión con la proteína VP5 se mantiene, demostrando que VP5 se asocia a la membrana plasmática de las células transfectadas. Además, la fluorescencia roja observada en el núcleo se mantiene indicando que el tratamiento con digitonina queda circunscripto a la membrana plasmática sin afectar otros compartimentos celulares (Figura 17).

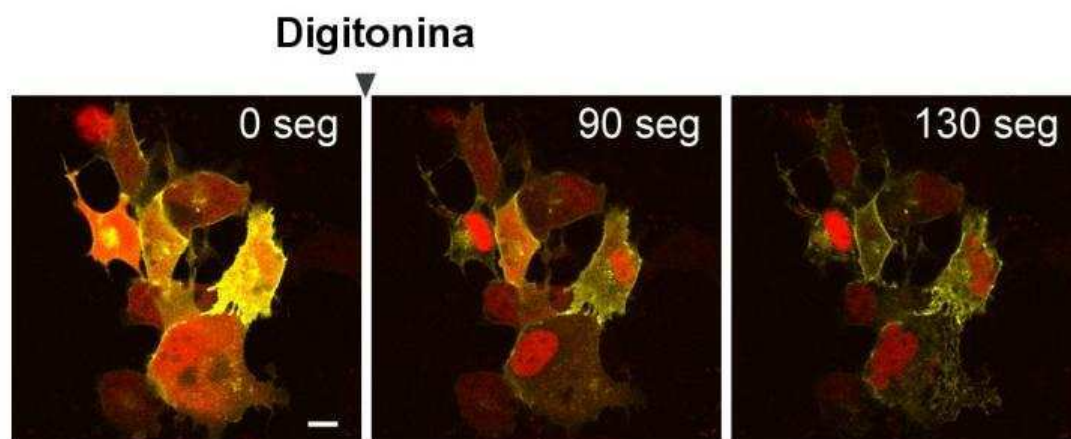


Figura 17: La proteína VP5 está asociada a la membrana plasmática de las células QM-7. Se cotransfectaron células QM-7 con los plásmidos pYFP-VP5 y pCherry. Manteniendo en el campo visual células que expresan ambas fusiones, se agregó digitonina para llegar a una concentración final de 50 μM y se filmaron las células en tiempo real. Se observa cómo la fluorescencia roja se disipa (salvo la que está en el núcleo), mientras que la fluorescencia amarilla (que corresponde a la fusión con la proteína VP5) se mantiene.

La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μm .

6.2.5. Análisis de la topología de VP5 en la membrana plasmática de células transfectadas

Dado que observamos a la proteína VP5 localizada en la membrana plasmática de las células QM-7 y ante la ausencia de estudios previos *in vivo* sobre este aspecto, decidimos analizar la topología de VP5 en la membrana plasmática, es decir, confirmar si se trata de una proteína de transmembrana y, en ese caso, qué región (N-terminal o C-terminal) expone hacia el espacio extracelular. Este aspecto es fundamental dado que determina la capacidad de VP5 de interactuar con proteínas celulares y de participar en vías de señalización (52).

Para estudiar la topología desarrollamos experimentos de protección de la fluorescencia a la proteasa. Este método propone realizar fusiones con el gen de

una proteína fluorescente, en N-terminal y C-terminal, al de la proteína de interés. Si la fluorescencia se encuentra del lado extracelular, al agregar al medio una proteasa ésta podrá degradar las proteínas expuestas apagando así la fluorescencia. En caso de que no pueda hacerlo por estar protegida en la célula, la fluorescencia se apagará luego del agregado de digitonina que, al crear poros en la membrana plasmática, da paso a la proteasa indicando que el extremo fusionado se encuentra dentro de la célula.

Por ejemplo, si la fusión se realizara en el extremo N-terminal de una proteína que expone hacia el medio extracelular esta región, la fluorescencia se apagaría sin el agregado de digitonina indicando la orientación de la proteína de interés.

Como se observa en la Figura 18, al realizar los experimentos, tanto en las células que expresan la fusión de la proteína VP5 en N-terminal (YFP) como la fusión en C-terminal (CFP), no observamos el apagado de la fluorescencia al tratar las células con proteasa (proteínasa K). El agregado de digitonina, en combinación, sí aplacó la fluorescencia (Figura 18). Esto indica que VP5 no es una proteína de transmembrana sino que se encuentra asociada a la misma del lado citoplasmático.

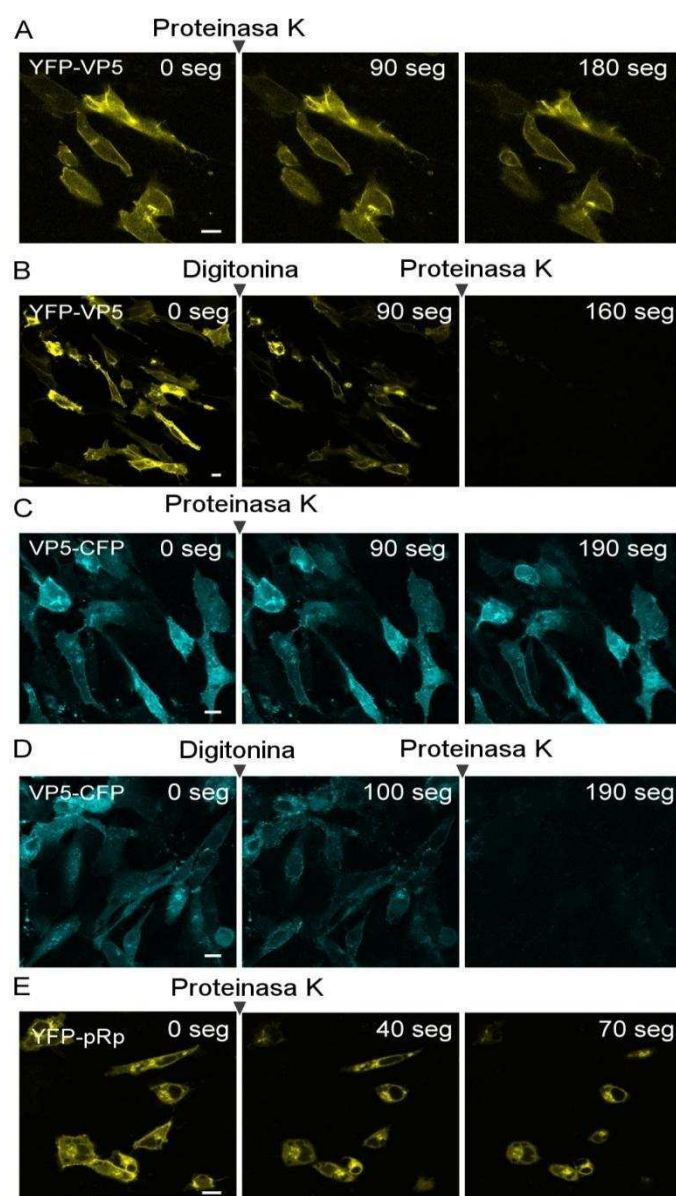


Figura 18: Ensayo de Protección de la fluorescencia a la proteasa. A: Se transfectaron células QM-7 con el vector que porta el gen de la proteína fluorescente YFP (amarilla) en el extremo N-terminal del gen de la proteína VP5 y se trataron con proteinasa K. Se observa que la fluorescencia queda retenida en la membrana. B: El agregado de digitonina previo a la proteasa provoca el apagado de la fluorescencia en 160 segundos, indicando que el extremo N-terminal de la proteína VP5 se encuentra dentro de la célula transfectada. C: Se transfectaron células QM-7 con el vector que porta el gen de la proteína fluorescente CFP (cian) en el extremo C-terminal del gen de la proteína VP5 y se trataron con proteinasa K. Se observa que la fluorescencia queda retenida en la membrana. D: El agregado de digitonina previo a la proteasa provoca el apagado de la fluorescencia en 190 segundos, indicando que el extremo C-terminal de la proteína VP5 se encuentra dentro de la célula transfectada. E: Control del experimento de protección de la fluorescencia a la proteasa. Se observan células QM-7 transfectadas con el plásmido que porta el gen de la proteína PrP (descrita como proteína de transmembrana que expone su dominio N-terminal hacia el espacio extracelular)

fusionado en N-terminal al gen de la proteína YFP. Se observa que el agregado de proteasa provoca el apagado de la fluorescencia amarilla indicando que el método funciona correctamente en el modelo celular utilizado. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

Para confirmar este hecho realizamos el mismo experimento pero con el gen de la proteína priónica PrP fusionado a YFP en N-terminal bajo promotor constitutivo CMV (pYFP-PrP). Este vector fue cedido por el doctor Holger Lorenz, quien desarrolló el método anteriormente descrito. La proteína PrP es una proteína de transmembrana y expone hacia el espacio extracelular la región N-terminal. Cuando transfectamos células QM-7 con el pYFP-PrP vemos que al agregar la proteasa, la fluorescencia amarilla se disipa indicando que en nuestro modelo el experimento funciona correctamente (Figura 18).

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

7.DISCUSIÓN

Mantener el buen estado sanitario de los animales de producción es sumamente importante. Más aún cuando se trata de animales de producción intensiva donde la introducción de un patógeno puede producir grandes pérdidas. De ese modo, conocer aspectos de la respuesta del hospedador y la estrategia del agente infeccioso para replicarse es de particular importancia.

Este trabajo de Tesis abordó dos aspectos relacionados con IBDV y la interacción con su hospedador natural. En una primera parte se analizó la respuesta inmune de aves infectadas con una cepa de IBDV de virulencia intermedia y el estudio de la apoptosis inducida por este virus. En la segunda parte, se analizó la localización subcelular y la topología de la proteína no estructural VP5 cuya función aún no se ha determinado con claridad.

Primera parte

Para profundizar el estudio de la respuesta inmune que induce IBDV en el pollo, se analizó el perfil de expresión génica de citoquinas producidas en el bazo, el duodeno y la bursa de Fabricio, ya que son los principales órganos implicados.

El virus ingresa por vía oral y, en un principio, puede replicar en células de los tejidos linfoides asociados al intestino (100). Por esta razón, muchas vacunas anti IBDV formuladas a virus vivo se suministran por vía oral. Sin embargo, la ruta intramuscular de inoculación también confiere inmunidad anti IBDV y las mismas vacunas vivas se utilizan rutinariamente por esta vía de inoculación (OIE-Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, 2010, <http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/aindex.htm>).

Por otra parte, tanto las vacunas recombinantes como las basadas en virus inactivado, son inoculadas por vía intramuscular. De esta manera, es relevante el conocimiento que surge de la comparación de los efectos que genera la inoculación del virus por las vías oral e intramuscular. La infección con IBDV de alta virulencia provoca la producción de citoquinas proinflamatorias por parte los macrófagos, alcanzando sus niveles más altos durante la fase temprana de la replicación del virus (36, 70). En ese sentido, se analizó la respuesta inducida por ambas vías de inoculación a partir del estudio del perfil de expresión de ARNm de citoquinas tales como INF γ , IL-6, IL-15 y LITAF a 1, 3 y 5 dpi.

En general, las modificaciones en la expresión de citoquinas fueron más fuertes en el bazo y el duodeno cuando se utilizó la vía intramuscular en comparación con la

vía oral.

A su vez, la mayor sobreexpresión de IL-6 se observó en la bursa de Fabricio a los 3 dpi cuando los animales fueron inoculados por vía oral. Esta variación de IL-6, junto con una fuerte infiltración de linfocitos T en la bursa, fueron descritos previamente como consecuencia de la inoculación de pollos con virus de alta virulencia (38). La llegada del virus a su órgano blanco se relaciona con su capacidad de replicar en los macrófagos del sistema digestivo y el acceso de éstos a la bursa de Fabricio. De este modo, sería esperable que, utilizando la vía intramuscular, el virus no pueda acceder a este órgano. Sin embargo, se observó infiltración de linfocitos T con niveles similares en ambos casos (Tabla 5). Asimismo, las células provenientes del bazo de los animales inoculados por vía intramuscular mostraron una notable disminución de la capacidad de responder a estímulos como la Concanavalina A (Figura 8). Esto indicaría que aunque no se produce un fuerte incremento de la expresión de citoquinas proinflamatorias en la bursa de Fabricio a 5 dpi por vía intramuscular, persistiría la capacidad de IBDV de producir inmunosupresión.

Recientemente, Shanmugasundaran y colaboradores, describieron los linfocitos T de timo de pollo. Los autores definieron a estas células como positivas para los marcadores CD4 y CD25 y poseen características similares a los linfocitos T-regulatorios. Entre otras funciones, secretan el factor de crecimiento tumoral beta ($TGF\ \beta$) y la IL-10. Estas dos citoquinas son antiinflamatorias y capaces de suprimir la proliferación *in vitro* de linfocitos T. Estas funciones las conservan aún sin que se encuentre expresado el factor de transcripción FOXP3 (marcador, junto con CD4 y CD25 de este tipo celular en mamíferos) (86). A su vez, Kim y colaboradores describieron los linfocitos que se infiltran en la bursa de Fabricio al infectar pollos con cepas de alta virulencia de IBDV que identificaron como CD4+ CD25+ (38). En un trabajo del mismo grupo se demostró que las células provenientes de la bursa de animales infectados con IBDV no responden a mitógenos de los linfocitos T (37). Teniendo en cuenta entonces esta información, es posible pensar que la inmunosupresión a nivel celular que provoca IBDV, estaría siendo llevada a cabo por linfocitos T-Reg que se infiltran en la bursa de Fabricio y que este efecto se produce también cuando los animales son inoculados con cepas de virulencia intermedia, al menos, si el mismo entra por vía sistémica.

Por otro lado, mediante las dos vías estudiadas en este trabajo observamos que el IBDV provoca un incremento de las células CD3-, CD8 $\alpha\alpha$ + en la bursa de Fabricio. Las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) se describieron en aves y están definidas como CD8+ y a su vez carentes de marcadores de linaje T o B

(21). Dado que no se detectan, a 5 dpi, diferencias entre las poblaciones que expresan el marcador Bu-1 (de células B, dato no mostrado) podemos afirmar que se trata de este tipo celular. El rol de las células NK en la infección con IBDV aún no está bien definido. En 1983, Sharma y Lee determinaron que la infección con IBDV no causa efectos en las células NK (89). Años más tarde, Kumar y colaboradores observaron una severa disminución en la función de estas células luego de la infección con IBDV (39). En concordancia con este trabajo, Rauf y colaboradores demostraron una reducción en animales tratados con IBDV en la expresión de las moléculas efectoras de las células NK que son las granzimas y perforinas (75). El hecho de observar la infiltración de este tipo celular en conjunto con la inmunosupresión abre nuevos interrogantes acerca de cómo el virus es capaz de reducir la capacidad de respuesta a las células que acuden al órgano blanco luego de la infección con IBDV. Asimismo, nosotros encontramos cambios, como una caída en la expresión de IL-15, citoquina activadora de células NK cuando el virus es inoculado por vía intramuscular que podría aportar datos acerca del papel de estas células en la infección con IBDV aunque son necesarios estudios más profundos a fin de determinar el rol de esta citoquina en la infección con IBDV.

Respecto a la inmunidad humoral, ambas rutas de inoculación lograron inducir la producción de altos títulos de anticuerpos específicos anti IBDV (datos no mostrados).

A partir de estos resultados (la infiltración de linfocitos y la fuerte sobreexpresión de citoquinas inflamatorias en la bursa) fue posible utilizar estos signos como marcadores de infección con IBDV y realizar ensayos de desafío con altas dosis de una cepa vacunal sin la necesidad de utilizar cepas virulentas en experimentos de prueba de eficiencia de vacunas experimentales y de inmunógenos contra IBDV ((22), Chimeno Zoth et al., artículo en revisión). La posibilidad de reemplazar el uso de cepas altamente virulentas por cepas de virulencia intermedia, al menos en ensayos de laboratorio, representa una gran ventaja, dado que IBDV es un virus altamente resistente. Incluso, la máxima radiación con rayos gama aprobada por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos para esterilizar alimentos antes del ingreso a ese país (3.0 KiloGrays) es inocua para las cepas de alta virulencia de IBDV. Estas características hacen que la eliminación del virus del laboratorio, luego de un ensayo de desafío, no sea una tarea simple y que requiera de cuidados especiales (32).

La vacunación convencional por vía oral de virus IBDV atenuados tiene algunas desventajas como su capacidad de generar un grado de atrofia en la bursa y la consiguiente inmunosupresión que, junto con otros aspectos como la infección con

otros patógenos, puede generar severos inconvenientes en la producción (60). De ese modo, la vacunación intramuscular podría ser una alternativa, ya que se observan efectos distintos y, aunque ocurre una infiltración de linfocitos T similar utilizando ambas vías, el ingreso del virus por vía intramuscular no induce la fuerte sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias, aunque ambos inducen similares niveles de anticuerpos. En principio, esta observación nos permitiría pensar que esta vía de inoculación es más segura. Sin embargo, se observa que la inoculación de IBDV por vía intramuscular provoca una disminución en la capacidad de los esplenocitos de responder a mitógenos como la Concanavalina A, por lo que consideramos que habría que continuar estudiando los efectos adversos de cada vía de inmunización así como la forma de aplicación de cada una de ellas, aspecto que resulta de gran relevancia en animales de producción intensiva.

El Interferón alfa (INF α), que junto con el interferón beta (INF β) componen la familia de los interferones de tipo 1, es una citoquina fundamentalmente antiviral. En general, ambos son secretados por células infectadas con virus y desatan una respuesta que incluye mecanismos innatos y adaptativos, tales como la producción de citoquinas, aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1 y la atracción de células T citotóxicas al sitio de infección (94). En ese sentido, Eldaghayes y colaboradores destacaron la ausencia inesperada de aumento de los niveles de ARNm de INF α en la bursa de animales infectados con cepas virulentas y muy virulentas de IBDV (17). Trabajos previos a la descripción de las citoquinas involucradas en la respuesta a IBDV, habían demostrado que las cepas atenuadas del virus estimulaban la liberación de un factor antiviral (20).

En el presente trabajo, analizamos la expresión de INF α observando que los animales inoculados por vía intramuscular mostraron un incremento de alrededor de 5 veces en la cantidad de ARNm en su duodeno a 1 y 3 días post inoculación. Cuando el virus fue suministrado por vía oral, la sobreexpresión de INF α se detectó a estos mismos tiempos en el duodeno y en la bursa de Fabricio. Este resultado podría explicar, en parte, la diferencia en el grado de patogenicidad entre cepas, dado que los animales infectados con cepas de alta virulencia parecen fallar en su respuesta antiviral y en el presente estudio, cuando los animales fueron infectados con una cepa intermedia, fueron capaces de producir INF α . En coincidencia con nuestra observación, Rauf y colaboradores demostraron que las cepas clásicas de IBDV inoculadas por vía oral promueven una caída en la expresión del ARNm de INF α a los 3 dpi en la bursa, pero diferentes cepas (de menor virulencia) son capaces de aumentarla (75).

Estos resultados ponen en evidencia la importancia de la vía de inoculación del virus ya que, al menos en lo que refiere a la activación del sistema inmune y a la inmunosupresión a nivel de linfocitos T, diferentes vías provocan variaciones en la respuesta inmune.

Durante el año 2013, se produjo un fuerte brote de bronquitis infecciosa en granjas comerciales de la provincia de Entre Ríos. Se trata de una enfermedad aguda, altamente contagiosa que afecta el tracto respiratorio alto de los pollos; también puede afectar los sistemas renal y reproductivo. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas ya que reduce la conversión alimentaria en pollos de engorde, declina la producción de huevos en aves de postura y provoca una disminución de la fertilidad en los animales reproductores. La enfermedad es causada por el virus de la bronquitis infecciosa (IBV). El mencionado brote del año 2013 condujo a la aprobación, por parte del SENASA, de una nueva vacuna a virus vivo para el IBV inédita en Argentina.

Las cepas causantes del brote fueron denominadas AV1308 y AV1314 y pertenecen al genotipo A del IBV. Llamativamente, al infectar pollos SPF con dichos aislamientos, no se observó la aparición de signos clínicos característicos de la enfermedad, aunque los aislamientos evaluados demostraron capacidad de replicar en las aves inoculadas (Vagnozzi et al., comunicación personal).

Como se mencionó en la sección Introducción, es común la coinfección con diferentes patógenos en las granjas. Por este motivo, se evaluó si la inmunosupresión causada por IBDV podría tener implicancias en una situación similar al brote de IBV descripto.

Los ensayos de coinfección mostraron que el tratamiento de los animales con IBDV 5 días antes del desafío con IBV, induce mayores niveles de replicación del segundo agente en los principales órganos blanco del virus (Figura 9). Este dato podría explicar, en parte, el hecho de que las cepas aisladas de IBV en el brote del 2013 no causaron enfermedad en animales SPF cuando se ensayaron en el laboratorio, sugiriendo que las características agresivas del brote en cuestión podrían estar relacionadas con una deficiencia del estado inmunitario de los animales, generalmente asociado al sistema de cría intensiva, más que con un mayor grado de virulencia del virus que lo ocasiona.

Otro aspecto que se analizó en este trabajo de tesis fue el rol del virus en cuanto a la apoptosis. En el caso de IBDV, al tratarse de un virus desnudo, requiere que la célula hospedadora se destruya para poder egresar de la misma. En este sentido, algunos reportes le atribuyen a diferentes proteínas virales, distintos roles en la

apoptosis. Las proteínas estructurales VP2 y VP3 serían inductores apoptóticos, aunque esta última en menor medida (50). Los reportes acerca del rol de la proteína no estructural VP5, en cambio, son contradictorios. Algunos autores le atribuyen un rol inductor, otros, un rol inhibitorio y, finalmente, hay quienes demuestran que no está involucrada en este proceso (44, 105, 109).

Para analizar el papel de IBDV en la apoptosis, realizamos ensayos de tinción con Ioduro de Propidio y citometría de flujo en células infectadas. Los mismos demostraron que el virus provoca la degradación del genoma celular a partir de las 24 horas post infección (Figura 10). A su vez, las células transfectadas con el gen de la proteína VP5 a 24 y 48 horas post transfección no mostraron diferencias en este proceso (datos no mostrados). Una posible explicación para el resultado observado es que este ensayo detecta estadios muy avanzados de la apoptosis y la sola expresión de la proteína viral no induce cambios en los tiempos que analizamos. El mismo ensayo se realizó también utilizando células DT-40, que provienen de linfocitos B de pollos, sin observar diferencias entre las células infectadas y las células control.

Con el objetivo de aportar más datos, medimos la activación de la cisteín proteasa efectora de la apoptosis Caspasa 3. En células QM-7 infectadas observamos una sutil activación de este efector respecto al control. Sin embargo, la infección de células DT-40 reveló una reducción de la activación de Caspasa 3. Este resultado, que resulta llamativo, puede explicar en parte el hecho de que la infección de estas células con IBDV no produce un efecto citopático visible aunque el virus es capaz de infectarlas y replicar en ellas. Incluso, se ha reportado que pueden causar infección persistente en este tipo celular (12). Por otra parte, esta observación nos condujo a analizar la posibilidad de que el virus sea capaz de alterar la expresión génica de este efector, ya que existen reportes previos que le atribuyen, a proteínas no estructurales de diferentes virus, la capacidad de regular la expresión génica de efectores apoptóticos (112).

Al analizar la expresión génica de Caspasa 3 en células QM-7 observamos que, si bien la infección con el virus incrementa su expresión génica, la transfección con el gen de la proteína VP5 provoca la reducción de su mensajero (Figura 12) en concordancia con lo observado en las células DT-40.

Estos ensayos fueron realizados utilizando células QM-7 debido a que no fue posible transfectar células DT-40, que crecen en suspensión y, aunque existen protocolos para su transfección, lamentablemente no pudimos lograrla ni por métodos basados en cationes lipídicos, ni por medio de la electroporación.

Por otra parte, el resultado observado en las células mioblásticas podría estar subestimado ya que la eficiencia de transformación que obtuvimos con este tipo celular fue aproximadamente del 40 %, por lo que la reducción de la expresión génica de Caspasa 3 podría ser mucho mayor si sólo analizáramos las células transfectadas.

Este resultado demuestra la capacidad de IBDV de regular delicadamente los procesos celulares a fin de poder completar su ciclo de replicación. En particular, la apoptosis es un proceso que los virus muchas veces manipulan debido a que requieren de la maquinaria celular para su replicación y la presencia de componentes virales, como el ARN doble cadena, el ADN rico en GC, entre otros, son capaces de desatar este proceso. De ese modo, existen virus capaces de inhibir la apoptosis en los primeros estadios del ciclo de replicación viral y luego inducirla para permitir la salida del virus (112).

Estos resultados abren nuevos interrogantes acerca de cómo IBDV es capaz de regular la expresión génica de Caspasa 3 y a qué tiempos, dado que, más allá de la capacidad que tendría la proteína VP5 de impedir este proceso, invariablemente se observa la inducción de apoptosis a las 24 horas post infección en cultivo celular.

Segunda parte

Como se expresó anteriormente, en una segunda parte de este trabajo de tesis analizamos la localización subcelular de la proteína VP5 de IBDV.

La localización de las proteínas es fundamental para llevar a cabo su función (52). Estudios previos demostraron que la proteína viral VP5 se localiza preferentemente en la membrana de las células infectadas (51).

Sin embargo, se reportó que VP5 se localiza en las mitocondrias de las células transfectadas y ejecuta parte de su función a partir de la interacción con canales iónicos dependientes de voltaje propios de la mitocondria (44).

Cabe destacar que estos ensayos se realizaron en células de mamífero transfectadas con la proteína viral y, si bien el virus es capaz de replicar en este tipo celular, éstas difieren notablemente del blanco natural de IBDV.

Por otra parte, experimentos realizados en nuestro laboratorio no detectaron colocalización de VP5 con mitocondrias utilizando un marcador fluorescente de esta organela (datos no mostrados).

En el trabajo del año 2000 mencionado anteriormente, Lombardo y colaboradores determinaron mediante estudios *in silico* que VP5 es una proteína de

transmembrana y su dominio hidrofóbico le permite atravesar la membrana plasmática de la célula infectada exponiendo el dominio N-terminal al espacio extracelular (51).

Para confirmar esta información, en primer lugar, realizamos estudios *in silico* que consistieron en predicciones de dominios de transmembrana a través de servidores que son de acceso público (25, 35, 68, 101-103). Los resultados, mostrados en la Tabla 6 dan cuenta de la discrepancia entre los distintos métodos acerca de si VP5 es o no una proteína de transmembrana. Sin embargo, no encontramos diferencias entre las proteínas VP5 de la cepa utilizada en este trabajo de tesis y de la cepa analizada en el trabajo de Lombardo y colaboradores. Esto indica que, utilizando este método, no sería posible asignarle una localización subcelular a VP5.

De esta manera, diseñamos experimentos para verificar si VP5 efectivamente es una proteína de membrana. Para esto construimos vectores que portan fusiones del gen de la nombrada proteína con el de proteínas fluorescentes en ambos extremos. Los resultados obtenidos mostraron que en las células aviares transfectadas, tanto con los vectores que portaban fusiones en el extremo N-terminal como en el C-terminal, la fluorescencia se localizó preferentemente en la membrana plasmática.

Cabe destacar la necesidad de realizar ensayos con fusiones en ambos extremos ya que la ubicación de la misma puede alterar la localización correcta de la proteína que se analiza (55, 69).

Asimismo, confirmamos la localización de la proteína en la membrana plasmática observando su colocalización con proteínas conocidas de transmembrana y marcadores que la tiñen (Figura 15, Figura 16).

Cuando cotransfectamos las células QM-7 con las fusiones de los genes de VP5 y proteínas fluorescentes y los de proteínas fluorescentes sin fusión (bajo promotores constitutivos) observamos, por un lado, la fluorescencia emitida por la proteína no fusionada en el citoplasma y en el núcleo celular y, por otro lado, la fluorescencia que aportaba la proteína fusionada con VP5, en la membrana plasmática.

Al tratar con agentes que inducen poros en la membrana, la fluorescencia citoplasmática de la proteína sin fusión se dispersa y la nuclear se mantiene, mientras que la fluorescencia que aporta la proteína fusionada a VP5 queda retenida en la membrana (Figura 17). Este resultado indica que VP5 se encuentra

directa o indirectamente asociada a la membrana plasmática y que el tratamiento con el agente que induce poros fue suave, ya que su acción se mantuvo limitada a la membrana plasmática, sin afectar la envoltura nuclear.

De este modo confirmamos que en nuestro modelo de transfección de células provenientes de ave, VP5 se localiza en la membrana plasmática, manteniéndose retenida en este compartimento. Este dato es consistente con diferentes trabajos previos que utilizan la marcación de células transfectadas con anticuerpos específicos para estudiar la localización de VP5 (51, 109).

Una vez confirmada la localización de VP5 en la membrana plasmática de células aviares, abordamos el análisis de su topología observando que VP5 no es una proteína de transmembrana sino que se encuentra asociada directa o indirectamente a ésta, conteniendo sus dos extremos en el interior de la célula (Figura 18).

En un trabajo reciente, Delgui y colaboradores estudiaron la localización subcelular de la proteína VP3 de IBDV usando la misma línea celular que utilizamos en el presente trabajo, en ese trabajo ellos determinaron la importancia de la localización de VP3 en endosomas tempranos formando pequeños pilones con las membranas externas del aparato de Golgi. Los autores utilizaron un enfoque similar al que usamos en el presente trabajo, transfectando células QM-7 con plásmidos de expresión con los genes de la nombrada proteína viral (13).

Como se expresó anteriormente, existen pocos miembros conocidos de la familia *Birnaviridae*, siendo IBDV el virus más estudiado. No obstante, en los últimos años, y dada su relevancia en la industria piscícola, el IPNV ha sido estudiado con bastante profundidad. La proteína VP5 de este virus fue identificada como miembro de la familia Bcl-2. Esta familia de proteínas, muy estudiada en mamíferos, es capaz de regular la apoptosis a través de un sistema de puntos de control y de la interacción directa con proteínas pro o anti apoptóticas (57). La presencia o ausencia de ciertos dominios es lo que define esta particularidad. Por ejemplo, la proteína Bcl-2 antiapoptótica posee los dominios BH4, BH3, BH1, BH2 y un dominio de transmembrana. Mientras que los efectores proapoptóticos como BAK, BAX y BOK carecen del dominio BH4.

En esta parte del trabajo, utilizamos el programa T-Coffee (64), que realiza alineamientos estructurales de proteínas, más allá de su secuencia aminoacídica. Al alinear la proteína Bcl-2 de pollo, que se encuentra bien caracterizada (16), con la proteína VP5 de IBDV encontramos similitudes en los dominios BH3, BH1 y BH2. En cambio, al alinear VP5 de IPNV con Bcl-2 de Zebra Fish (especie más cercana al

salmón con genoma secuenciado y anotado) encontramos similitud con todos los dominios de Bcl-2, incluido BH4. En ambos casos, la proteína VP5 carece del putativo dominio de transmembrana que posee la versión antiapoptótica de Bcl-2 (datos no mostrados). Este hecho, que requiere futuros estudios a fin de determinar la funcionalidad de estos dominios, podría arrojar evidencia acerca de las diferencias entre la VP5 de IPNV (cuya función antiapoptótica está confirmada) y la de IBDV (cuyo papel aún no ha sido determinado con exactitud).

Respecto a la disminución en la expresión génica de Caspasa 3 en células transfectadas con VP5, existen trabajos recientes realizados en pollos que relacionan la expresión de Bcl-2 y la de Caspasa 3 de modo inverso (28, 108).

Aunque resulta necesario realizar estudios con mayor profundidad, las evidencias obtenidas hasta el momento sugieren que algún dominio de VP5 podría estar desencadenando la represión de la expresión génica de Caspasa 3.

La secuencia de la proteína VP5 está muy conservada entre cepas de distinta virulencia. La secuenciación del gen de la proteína VP5 que utilizamos en el presente trabajo confirmó que la secuencia es muy similar a todas las disponibles (identidad superior al 98 %) y la localización, que predicen los métodos bioinformáticos, es la misma para todas las secuencias disponibles (Tabla 6, datos no mostrados). Sin embargo, la evolución de esta proteína viral es particularmente interesante ya que su región N-terminal proviene de un marco de lectura superpuesto con el gen de la proteína VP2, lo que indicaría una evolución limitada. En un trabajo reciente, Hernández y colaboradores demostraron que la evolución de VP5 está relacionada a la aparición de codones de iniciación previos de modo de sumar aminoácidos a la región N-terminal (23). Este mecanismo se denomina *overprinting* y está descrito en varias familias de virus de ARN (7, 71, 80). En el mismo trabajo, los autores demostraron que, a diferencia de lo reportado previamente, este mecanismo no está restringido sólo a las cepas virulentas de IBDV. Otro aspecto interesante es que la relación dN/dS (es decir la relación de cambios no sinónimos versus cambios sinónimos) encontrados entre las diferentes cepas de VP5 es cercano a 1, lo que indicaría que se trata de una proteína cuyos cambios son neutros para el *fitness* viral. Sin embargo, al diferenciar esta relación entre la región superpuesta y la no superpuesta del gen de VP5 se observa que la mayor parte de los cambios en la región no superpuesta son en la tercera base del codón (donde los cambios nucleotídicos, en general, no provocan cambios aminoacídicos). En cambio, en la región superpuesta, los cambios ocurren predominantemente en la primera base del codón donde suele ser no sinónimos pero corresponden a la tercera base del triplete del gen de la proteína VP2 que,

dada su función, soportaría menos cambios que VP5. De ese modo, al contar el valor dN/dS de toda la proteína se obtiene así un valor cercano a 1.

En el presente trabajo demostramos que, en contraposición a lo observado analizando VP5 con métodos bioinformáticos y a lo reportado anteriormente, la proteína VP5 no es una proteína de transmembrana ya que, tanto la fusión de proteínas fluorescentes en el extremo C-terminal como en el N-terminal, se encuentran del lado citoplasmático. Este resultado es novedoso y nos alienta a continuar con la caracterización de esta proteína viral en cuanto a, por ejemplo, su interacción con proteínas de la célula hospedadora. En ese sentido Wei y colaboradores demostraron que VP5 inhibe la apoptosis temprana mediante la interacción con la subunidad alfa de PI3K (que se encuentra en la membrana plasmática). A su vez, la interacción entre VP5 y PI3K es crítica para inhibir la apoptosis (105). Respecto a esto, el hecho de que VP5 no tiene dominios extracelulares amplía las posibilidades de interacción con PI3K y con el resto de los componentes localizados en el interior de la célula hospedadora.



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias

8.CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo de tesis permitió la puesta a punto de diversas metodologías sumamente útiles para el estudio de la inmunidad aviar. Asimismo, hizo posible la identificación de una variedad de efectos causados por el virus y su comparación según la vía de inoculación. Por otra parte, en este trabajo se verificó la inmunosupresión a nivel funcional que causan altas dosis de la cepa de virulencia intermedia de IBDV inoculado tanto por vía oral como intramuscular. Por último, se desarrolló un modelo de desafío con IBDV evitando la manipulación de cepas altamente virulentas.

En lo que respecta a la proteína viral VP5, se determinó la localización de la misma en la célula hospedadora, aportando evidencias que se contraponen con los resultados publicados hasta el momento. Además, se obtuvieron datos muy interesantes acerca del rol que cumple esta proteína en la expresión génica del efector apoptótico Caspasa 3.

Los resultados en el presente trabajo plantean nuevos interrogantes acerca de la identidad de las proteínas que podrían interactuar con VP5 en la membrana plasmática y acerca de la capacidad de esta proteína viral de alterar el mecanismo de apoptosis celular en el contexto de infección.

De los resultados obtenidos, surgen las siguientes conclusiones:

- 1- La infección de pollos con IBDV de virulencia intermedia induce la producción de citoquinas proinflamatorias. Este efecto es independiente de la vía de inoculación utilizada.
- 2- Los signos observados en pollos infectados con IBDV de virulencia intermedia son válidos para utilizar este modelo en pruebas de desafío viral.
- 3- La infección con IBDV aumenta la susceptibilidad de las aves a infecciones con otros patógenos virales.
- 4- Los aislamientos de IBV obtenidos a partir del brote de bronquitis infecciosa del año 2013 mostraron mayor capacidad de replicación en pollos previamente infectados con IBDV.
- 5- La proteína VP5 de IBDV no es de transmembrana, aunque se localiza en la membrana plasmática, posiblemente asociada a la misma, conservando ambos extremos del lado citoplasmático.



Estudio de la relación del virus de la Bursitis Infecciosa con su hospedador. Análisis de la respuesta inmune y de la función y localización de la proteína viral VP5.

Juan Manuel **Carballeda**

Contenido

Introducción

Hipótesis

Objetivos

Materiales y Métodos

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias

9. REFERENCIAS

1. **Bernard, J.** 1980. Drosophila X virus RNA polymerase: tentative model for in vitro replication of the double-stranded virion RNA. *Journal of virology* **33**:717-723.
2. **Bolcato-Bellemin, A. L., M. G. Mattei, M. Fenton, and S. Amar.** 2004. Molecular cloning and characterization of mouse LITAF cDNA: role in the regulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression. *J Endotoxin Res* **10**:15-23.
3. **Brownlie, R., J. Zhu, B. Allan, G. K. Mutwiri, L. A. Babiuk, A. Potter, and P. Griebel.** 2009. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol Immunol* **46**:3163-3170.
4. **Busnadiego, I., A. M. Maestre, D. Rodriguez, and J. F. Rodriguez.** 2012. The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PloS one* **7**:e46768.
5. **Cao, Y. C., W. S. Yeung, M. Law, Y. Z. Bi, F. C. Leung, and B. L. Lim.** 1998. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis* **42**:340-351.
6. **Cape, J. L., and J. K. Hurst.** 2009. The role of nitrite ion in phagocyte function- perspectives and puzzles. *Archives of biochemistry and biophysics* **484**:190-196.
7. **Carter, J. J., M. D. Daugherty, X. Qi, A. Bheda-Malge, G. C. Wipf, K. Robinson, A. Roman, H. S. Malik, and D. A. Galloway.** 2013. Identification of an overprinting gene in Merkel cell polyomavirus provides evolutionary insight into the birth of viral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:12744-12749.
8. **Cooper, M. D., D. A. Raymond, R. D. Peterson, M. A. South, and R. A. Good.** 1966. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* **123**:75-102.
9. **Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson.** 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein engineering* **10**:673-676.
10. **Chen, S., A. Cheng, and M. Wang.** 2013. Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds. *Veterinary research* **44**:82.
11. **DeBiasi, R. L., P. Clarke, S. Meintzer, R. Jotte, B. K. Kleinschmidt-Demasters, G. L. Johnson, and K. L. Tyler.** 2003. Reovirus-induced alteration in expression of apoptosis and DNA repair genes with potential roles in viral pathogenesis. *Journal of virology* **77**:8934-8947.
12. **Delgui, L., D. Gonzalez, and J. F. Rodriguez.** 2009. Infectious bursal disease virus persistently infects bursal B-lymphoid DT40 cells. *The Journal of general virology* **90**:1148-1152.

13. **Delgui, L. R., J. F. Rodriguez, and M. I. Colombo.** 2013. The endosomal pathway and the Golgi complex are involved in the infectious bursal disease virus life cycle. *Journal of virology* **87**:8993-9007.
14. **Dodgson, J. B., M. E. Delany, and H. H. Cheng.** 2011. Poultry genome sequences: progress and outstanding challenges. *Cytogenetic and genome research* **134**:19-26.
15. **Dorak, M.** 2006. Real-time PCR using SYBR Green. *Real Time PCR*, Cap 8:139-153.
16. **Eguchi, Y., D. L. Ewert, and Y. Tsujimoto.** 1992. Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo. *Nucleic acids research* **20**:4187-4192.
17. **Eldaghayes, I., L. Rothwell, A. Williams, D. Withers, S. Balu, F. Davison, and P. Kaiser.** 2006. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral immunology* **19**:83-91.
18. **Erf, G. F.** 2004. Cell-mediated immunity in poultry. *Poultry science* **83**:580-590.
19. **Galloux, M., S. Libersou, N. Morellet, S. Bouaziz, B. Da Costa, M. Ouldali, J. Lepault, and B. Delmas.** 2007. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem* **282**:20774-20784.
20. **Gelb, J., C. S. Eidson, O. J. Fletcher, and S. H. Kleven.** 1979. Studies on interferon induction by infectious bursal disease virus (IBDV). II. Interferon production in White Leghorn chickens infected with an attenuated or pathogenic isolant of IBDV. *Avian diseases* **23**:634-645.
21. **Gobel, T. W., B. Kaspers, and M. Stangassinger.** 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International immunology* **13**:757-762.
22. **Gomez, E., M. S. Lucero, S. Chimeno Zoth, J. M. Carballeda, M. J. Gravisaco, and A. Berinstein.** 2013. Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against infectious bursal disease virus. *Vaccine* **31**:2623-2627.
23. **Hernandez, M., P. Villegas, D. Hernandez, A. Banda, L. Maya, V. Romero, G. Tomas, and R. Perez.** 2010. Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus genes* **41**:59-66.
24. **Higgins, D. A., R. L. Cromie, G. Srivastava, H. Herzbeck, C. Schluter, J. Gerdes, T. Diamantstein, and H. D. Flad.** 1993. An examination of the immune system of the duck (*Anas platyrhynchos*) for factors resembling some defined mammalian cytokines. *Dev Comp Immunol* **17**:341-355.
25. **Hofmann, K., and W. Stoffel.** 1992. PROFILEGRAPH: an interactive graphical tool for protein sequence analysis. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **8**:331-337.
26. **Hong, Y. H., H. S. Lillehoj, S. H. Lee, D. Park, and E. P. Lillehoj.** 2006. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced

- TNF-alpha factor (LITAF). *Developmental and comparative immunology* **30**:919-929.
27. **Hong, Y. H., H. S. Lillehoj, E. P. Lillehoj, and S. H. Lee.** 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **114**:259-272.
 28. **Huang, J., H. Cui, X. Peng, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, and B. Wu.** 2013. The association between splenocyte apoptosis and alterations of Bax, Bcl-2 and caspase-3 mRNA expression, and oxidative stress induced by dietary nickel chloride in broilers. *International journal of environmental research and public health* **10**:7310-7326.
 29. **Hung, M. C., and W. Link.** 2011. Protein localization in disease and therapy. *Journal of cell science* **124**:3381-3392.
 30. **Ingrao, F., F. Rauw, B. Lambrecht, and T. van den Berg.** 2013. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental and comparative immunology* **41**:429-438.
 31. **Iqbal, M., V. J. Philbin, and A. L. Smith.** 2005. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* **104**:117-127.
 32. **Jackwood, D. J., S. E. Sommer-Wagner, and H. J. Pharo.** 2007. The use of gamma irradiation for the inactivation of infectious bursal disease viruses. *Avian diseases* **51**:606-608.
 33. **Jeurissen, S. H.** 1991. Structure and function of the chicken spleen. *Research in immunology* **142**:352-355.
 34. **Jungmann, A., H. Nieper, and H. Muller.** 2001. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *The Journal of general virology* **82**:1107-1115.
 35. **Juretic, D., L. Zoranic, and D. Zucic.** 2002. Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *Journal of chemical information and computer sciences* **42**:620-632.
 36. **Khatrı, M., J. M. Palmquist, R. M. Cha, and J. M. Sharma.** 2005. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus research* **113**:44-50.
 37. **Kim, I. J., and J. M. Sharma.** 2000. IBDV-induced bursal T lymphocytes inhibit mitogenic response of normal splenocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* **74**:47-57.
 38. **Kim, I. J., S. K. You, H. Kim, H. Y. Yeh, and J. M. Sharma.** 2000. Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of virology* **74**:8884-8892.
 39. **Kumar, P. A., S. K. Das, and J. R. Rao.** 1998. Effect of immunostimulation on cytotoxic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens in infectious bursal disease and *Eimeria tenella* infections. *Acta veterinaria Hungarica* **46**:1-11.
 40. **Labrada, L., X. H. Liang, W. Zheng, C. Johnston, and B. Levine.** 2002. Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel

- interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *Journal of virology* **76**:11688-11703.
41. **Le Gros, F. X., A. Dancer, C. Giacomini, L. Pizzoni, M. Bublot, M. Graziani, and F. Prandini.** 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* **27**:592-596.
 42. **Lee, S. H., H. S. Lillehoj, M. Jeong, E. Del Cacho, W. Min, Y. B. Sullivan, L. Kakach, J. W. LaBresh, and H. R. Kim.** Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken TL1A. *Vet Immunol Immunopathol* **159**:103-109.
 43. **Levy, A. M., E. D. Heller, G. Leitner, and I. Davidson.** 1999. Effect of native chicken interferon on MDV replication. *Acta Virol* **43**:121-127.
 44. **Li, Z., Y. Wang, Y. Xue, X. Li, H. Cao, and S. J. Zheng.** 2012. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *Journal of virology* **86**:1328-1338.
 45. **Lillehoj, H. S., W. Min, K. D. Choi, U. S. Babu, J. Burnside, T. Miyamoto, B. M. Rosenthal, and E. P. Lillehoj.** 2001. Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Veterinary immunology and immunopathology* **82**:229-244.
 46. **Lin, J. G., C. X. Zhang, and S. Suzuki.** 2005. An anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family from Marine Birnavirus inhibiting apoptosis of insect cells infected with baculovirus. *Virus genes* **31**:185-193.
 47. **Lin, T. W., C. W. Lo, S. Y. Lai, R. J. Fan, C. J. Lo, Y. M. Chou, R. Thiruvengadam, A. H. Wang, and M. Y. Wang.** 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *J Virol* **81**:8730-8741.
 48. **Lin, W., Z. Zhang, Z. Xu, B. Wang, X. Li, H. Cao, Y. Wang, and S. J. Zheng.** 2015. Association of Receptor of Activated Protein Kinase C 1RACK1with Infectious Bursal Disease Virus Viral Protein VP5 and VDACC2 Inhibits Apoptosis and Enhances Viral Replication. *The Journal of biological chemistry*.
 49. **Liu, M., and V. N. Vakharia.** 2006. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *Journal of virology* **80**:3369-3377.
 50. **Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Caston, J. Rivera, A. Fernandez-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F. Rodriguez.** 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of virology* **73**:6973-6983.
 51. **Lombardo, E., A. Maraver, I. Espinosa, A. Fernandez-Arias, and J. F. Rodriguez.** 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **277**:345-357.
 52. **Lorenz, H., D. W. Hailey, C. Wunder, and J. Lippincott-Schwartz.** 2006. The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology. *Nature protocols* **1**:276-279.
 53. **Mahgoub, H. A., M. Bailey, and P. Kaiser.** 2012. An overview of infectious bursal disease. *Archives of virology* **157**:2047-2057.

54. **Marcus, P. I., L. van der Heide, and M. J. Sekellick.** 1999. Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease. *J Interferon Cytokine Res* **19**:881-885.
55. **Maroniche, G. A., V. C. Mongelli, G. Llauger, V. Alfonso, O. Taboga, and M. del Vas.** 2012. In vivo subcellular localization of Mal de Rio Cuarto virus (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology* **430**:81-89.
56. **Mo, C. W., Y. C. Cao, and B. L. Lim.** 2001. The in vivo and in vitro effects of chicken interferon alpha on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection. *Avian Dis* **45**:389-399.
57. **Moldoveanu, T., A. V. Follis, R. W. Kriwacki, and D. R. Green.** 2014. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences* **39**:101-111.
58. **Moscovici, M. G., M. L. Siegel, and C. Moscovici.** 1989. Avian erythroblastosis virus transforms a novel mast cell-basophil precursor target in the Japanese quail. *J Virol* **63**:2335-2339.
59. **Muller, H., M. R. Islam, and R. Raue.** 2003. Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol* **97**:153-165.
60. **Muller, H., E. Mundt, N. Eterradossi, and M. R. Islam.** 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* **41**:133-139.
61. **Mundt, E., J. Beyer, and H. Muller.** 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *The Journal of general virology* **76 (Pt 2)**:437-443.
62. **Muskett, J. C., N. E. Reed, and D. H. Thornton.** 1985. Increased virulence of an infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. *Vaccine* **3**:309-312.
63. **Nawroth, P. P., I. Bank, D. Handley, J. Cassimeris, L. Chess, and D. Stern.** 1986. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* **163**:1363-1375.
64. **Notredame, C., and K. Suhre.** 2004. Computing multiple sequence/structure alignments with the T-coffee package. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxeavanis ... [et al.]* **Chapter 3**:Unit3 8.
65. **Ogawa, M., T. Yamaguchi, A. Setiyono, T. Ho, H. Matsuda, S. Furusawa, H. Fukushima, and K. Hirai.** 1998. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Arch Virol* **143**:2327-2341.
66. **Olah, I., and B. Glick.** 1979. Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies. *Poult Sci* **58**:195-210.
67. **Olah, I., A. Kupper, and Z. Kittner.** 1996. The lymphoid substance of the chicken's harderian gland is organized in two histologically distinct compartments. *Microscopy research and technique* **34**:166-176.
68. **Omasits, U., C. H. Ahrens, S. Muller, and B. Wollscheid.** 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30**:884-886.

69. **Palmer, E., and T. Freeman.** 2004. Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comparative and functional genomics* **5**:342-353.
70. **Palmquist, J. M., M. Khatri, R. M. Cha, B. M. Goddeeris, B. Walcheck, and J. M. Sharma.** 2006. In vivo activation of chicken macrophages by infectious bursal disease virus. *Viral immunology* **19**:305-315.
71. **Pavesi, A., G. Magiorkinis, and D. G. Karlin.** 2013. Viral proteins originated de novo by overprinting can be identified by codon usage: application to the "gene nursery" of Deltaretroviruses. *PLoS computational biology* **9**:e1003162.
72. **Peralta, A., G. A. Maroniche, V. Alfonso, P. Molinari, and O. Taboga.** 2013. VP1 protein of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) impairs baculovirus surface display. *Virus research* **175**:87-90.
73. **Poh, T. Y., J. Pease, J. R. Young, N. Bumstead, and P. Kaiser.** 2008. Re-evaluation of chicken CXCR1 determines the true gene structure: CXCLi1 (K60) and CXCLi2 (CAF/interleukin-8) are ligands for this receptor. *J Biol Chem* **283**:16408-16415.
74. **Rauf, A., M. Khatri, M. V. Murgia, K. Jung, and Y. M. Saif.** 2011. Differential modulation of cytokine, chemokine and Toll like receptor expression in chickens infected with classical and variant infectious bursal disease virus. *Veterinary research* **42**:85.
75. **Rauf, A., M. Khatri, M. V. Murgia, and Y. M. Saif.** 2011. Expression of perforin-granzyme pathway genes in the bursa of infectious bursal disease virus-infected chickens. *Developmental and comparative immunology* **35**:620-627.
76. **Rautenschlein, S., A. M. Sheikh, D. P. Patnayak, R. L. Miller, J. M. Sharma, and S. M. Goyal.** 2002. Effect of an immunomodulator on the efficacy of an attenuated vaccine against avian pneumovirus in turkeys. *Avian Dis* **46**:555-561.
77. **Rautenschlein, S., A. Subramanian, and J. M. Sharma.** 1999. Bioactivities of a tumour necrosis-like factor released by chicken macrophages. *Dev Comp Immunol* **23**:629-640.
78. **Rautenschlein, S., G. von Samson-Himmelstjerna, and C. Haase.** 2007. A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Veterinary immunology and immunopathology* **115**:251-260.
79. **Rautenschlein, S., H. Y. Yeh, and J. M. Sharma.** 2003. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian diseases* **47**:66-78.
80. **Sabath, N., A. Wagner, and D. Karlin.** 2012. Evolution of viral proteins originated de novo by overprinting. *Molecular biology and evolution* **29**:3767-3780.
81. **Scott, M. S., R. Oomen, D. Y. Thomas, and M. T. Hallett.** 2006. Predicting the subcellular localization of viral proteins within a mammalian host cell. *Virology journal* **3**:24.

82. **Schneider, K., R. Klaas, B. Kaspers, and P. Staeheli.** 2001. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem* **268**:4200-4206.
83. **Schultz, U., B. Kaspers, C. Rinderle, M. J. Sekellick, P. I. Marcus, and P. Staeheli.** 1995. Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity. *Eur J Immunol* **25**:847-851.
84. **Sekellick, M. J., J. W. Lowenthal, T. E. O'Neil, and P. I. Marcus.** 1998. Chicken interferon types I and II enhance synergistically the antiviral state and nitric oxide secretion. *J Interferon Cytokine Res* **18**:407-414.
85. **Shahsavandi, S., M. M. Ebrahimi, K. Sadeghi, and H. Mahravani.** 2014. Apoptotic response of chicken embryonic fibroblast cells to infectious bursal disease virus infections reflects viral pathogenicity. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **50**:858-864.
86. **Shanmugasundaram, R., and R. K. Selvaraj.** 2012. CD4+CD25+ Regulatory T cell ontogeny and preferential migration to the cecal tonsils in chickens. *PLoS one* **7**:e33970.
87. **Sharma, J. M.** 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in veterinary medicine* **41**:481-494.
88. **Sharma, J. M., I. J. Kim, S. Rautenschlein, and H. Y. Yeh.** 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* **24**:223-235.
89. **Sharma, J. M., and L. F. Lee.** 1983. Effect of infectious bursal disease on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: role of adherent cells in cellular immune suppression. *Infection and immunity* **42**:747-754.
90. **Shi, Z., Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu, and D. Zhang.** A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *J Biol Chem* **286**:4517-4524.
91. **Takimoto, T., K. Sato, Y. Akiba, and K. Takahashi.** 2008. Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. *J Immunol* **180**:8327-8332.
92. **Tanimura, N., and J. M. Sharma.** 1998. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Journal of comparative pathology* **118**:15-27.
93. **Taylor, R. C., S. P. Cullen, and S. J. Martin.** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**:231-241.
94. **Trinchieri, G.** 2010. Type I interferon: friend or foe? *The Journal of experimental medicine* **207**:2053-2063.
95. **Tsikas, D.** 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **851**:51-70.
96. **Tsukamoto, K., N. Tanimura, M. Mase, and K. Imai.** 1995. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis* **39**:844-852.

97. **Van Alten, P. J., and H. J. Meuwissen.** 1972. Production of specific antibody by lymphocytes of the bursa of Fabricius. *Science* **176**:45-47.
98. **Vancini, R., A. Paredes, M. Ribeiro, K. Blackburn, D. Ferreira, J. P. Kononchik, Jr., R. Hernandez, and D. Brown.** 2012. Espirito Santo virus: a new birnavirus that replicates in insect cells. *Journal of virology* **86**:2390-2399.
99. **Vasconcelos, A. C., and K. M. Lam.** 1994. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *The Journal of general virology* **75 (Pt 7)**:1803-1806.
100. **Vervelde, L., and T. F. Davison.** 1997. Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* **26**:803-821.
101. **Viklund, H., and A. Elofsson.** 2004. Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**:1908-1917.
102. **Viklund, H., and A. Elofsson.** 2008. OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **24**:1662-1668.
103. **von Heijne, G.** 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of molecular biology* **225**:487-494.
104. **Wands, J. R., D. K. Podolsky, and K. J. Isselbacher.** 1976. Mechanism of human lymphocyte stimulation by concanavalin A: role of valence and surface binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**:2118-2122.
105. **Wei, L., L. Hou, S. Zhu, J. Wang, J. Zhou, and J. Liu.** 2011. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology* **417**:211-220.
106. **Wei, L., M. R. Sandbulte, P. G. Thomas, R. J. Webby, R. Homayouni, and L. M. Pfeffer.** 2006. NFkappaB negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-influenza activity. *J Biol Chem* **281**:11678-11684.
107. **Weining, K. C., U. Schultz, U. Munster, B. Kaspers, and P. Staeheli.** 1996. Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *Eur J Immunol* **26**:2440-2447.
108. **Wu, B., H. Cui, X. Peng, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, and J. Huang.** 2014. Dietary nickel chloride induces oxidative stress, apoptosis and alters Bax/Bcl-2 and caspase-3 mRNA expression in the cecal tonsil of broilers. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **63**:18-29.
109. **Wu, Y., L. Hong, J. Ye, Z. Huang, and J. Zhou.** 2009. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Archives of virology* **154**:1873-1882.
110. **Xing, Z., C. J. Cardona, J. Li, N. Dao, T. Tran, and J. Andrada.** 2008. Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2. *J Gen Virol* **89**:1288-1299.

111. **Yip, C. W., C. C. Hon, F. Zeng, and F. C. Leung.** Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res* **165**:9-16.
112. **Zhang, C., Y. Yang, X. Zhou, Z. Yang, X. Liu, Z. Cao, H. Song, Y. He, and P. Huang.** 2011. The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: implication for virus-induced apoptosis. *Virology journal* **8**:181.