



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de la inducción del estado antiviral producido por el impacto de los baculovirus en el sistema inmune de mamíferos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Guido Nicolás Molina

Directora de tesis: Dra. María Paula Molinari

Consejero de Estudios: Dr. Luis Alberto Scolaro

Lugar de trabajo: Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular
(IABIMO), INTA - CONICET.

Buenos Aires, 2019

“Estudio de la inducción de un estado antiviral producido por el impacto de los baculovirus en el sistema inmune de mamíferos”

Los baculovirus son una familia de virus que posee un ciclo de vida bifásico, con virus derivados de cuerpos de oclusión (ODVs, del inglés *occlusion derived virions*) y virus brotados (BVs, del inglés *budded virions*). Ambos fenotipos difieren en sus funciones y mayormente en sus envolturas. Los BVs inducen una fuerte respuesta inmune innata en ratones y establecen un estado antiviral que permitió proteger inespecíficamente contra un desafío con virus de la fiebre aftosa (FMDV, del inglés *foot and mouth disease virus*). Se propuso estudiar la inducción del estado antiviral que producen los BVs al impactar en el sistema inmune innato de ratones, y evaluar si es posible utilizar esta estrategia en cerdos.

En este trabajo se halló que los IFNs de tipo I cumplen un rol fundamental para lograr protección contra FMDV y que las células NK, además de ser necesarias para la producción de IFN- γ por baculovirus, se requieren para controlar la enfermedad. Se determinó que los BVs difieren de los ODVs en su capacidad inmunoestimuladora y en su destino endosomal en células dendríticas, y que sus capacidades dependen de GP64 y, posiblemente, de su interacción con el receptor de manosa. En segunda instancia, los resultados *ex vivo* e *in vivo* demostraron que los BVs son capaces de inducir actividad antiviral mediada por IFN- α en cerdos, y sugirieron que hay producción de IFN- α por células dendríticas plasmocitoides y de IFN- γ por células NK. Los mediadores antivirales inducidos otorgaron protección contra FMDV en células no inmunes porcinas de la línea celular LFBK. Finalmente, si bien la generación de actividad antiviral no pudo mejorarse enriqueciendo el genoma del BV en motivos CpG para cerdos, el pseudotipado con G de VSV indujo mayores niveles de IFN- α .

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que el BV de AcMNPV es un promisorio agente para desarrollar estrategias antivirales contra FMDV en porcinos, y que es posible mejorar esta herramienta mediante enfoques biotecnológicos.

Palabras clave: baculovirus, inmunomoduladores, antiviral, respuesta inmune innata, interferones, células dendríticas, células NK, porcinos, virus de la fiebre aftosa

“Study of the induction of the antiviral status produced by the impact of baculoviruses on the immune system of mammals”

Baculoviruses are a family of virus that have a biphasic life cycle, with occlusion derived virions (ODVs) and budded virions (BVs). Both phenotypes have different envelopes and functions. In mice, BVs induce a strong innate immune response and establish an antiviral status at short term that allowed to protect against a challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV). It was proposed to study the induction of the antiviral status produced by the impact of BVs in the innate immune system of mice and to evaluate if it is possible to employ this strategy in pigs.

Firstly, the results of this work showed that type I IFNs are a key factor to achieve effective protection against FMDV in this model and that NK cells, besides they are necessary for the production of IFN- γ , they are needed to control the disease. Furthermore, it was determined that BVs and ODVs display different immune abilities and intracellular destiny in dendritic cells, and that the capacities of BVs depend on GP64 and, possibly, on its interaction with the mannose receptor. Secondly, the *ex vivo* and *in vivo* results demonstrated that BVs induced IFN- α mediated antiviral activity in pigs and suggested that there is production of IFN- α by plasmacytoid dendritic cells and IFN- γ by NK cells. The antiviral mediators induced by BVs protected porcine non immune cells (LFBK) against a challenge with FMDV. Finally, the pseudotyping of BVs with G-VSV glycoprotein, but not the enrichment of the BV genome with CpG motifs for swine, improved its capacity to induce IFN- α production.

The results presented in this work suggest that BV of AcMNPV is a promising agent to develop antiviral strategies against FMDV in pigs, and that it is possible to improve biotechnologically this tool.

Key words: baculovirus, immunomodulating agent, antiviral, innate immune response, interferon, dendritic cells, NK cells, porcine, foot-and-mouth disease virus

Agradecimientos

A CONICET, por otorgarme la Beca Interna Doctoral para poder realizar esta tesis, y al INTA, en especial al IAByMO y a su exdirectora la Dra. Ruth Heinz, por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

A Pau, mi directora, por guiarme y ayudarme un montón en mi carrera desde el principio, por tu buena onda para laburar y por toda la confianza que siempre ponés en mí. Mil gracias!!!

A Oscar, nuestro jefe del labo y ahora director del IAByMO, por todo lo que aprendí de vos en estos años, porque estás siempre para salvarnos y por la energía que le metés al grupo para hacer posible que disfrutemos de hacer ciencia.

A mis compañeros del labo por los mates, los cafes con Ingame y tantos lindos momentos, la paso muy bien trabajando con uds: Vic, Gaby, Nacho, Michay (por tener honor y pagar tus apuestas), y a mi amiga y co-becaria Sabri, por hacer mucho más divertidos estos años. También a Euge, Hora, Guada y todos los que pasaron por el labo.

A mis compañeros de Virus Animales: Andre, Marie, Juan, Sole, Pau DMZ, Deby, Gaby, Majo, Silvi, Eva, Analía, Guido y Rubén, por tantas tortas y momentos ricos y porque todos están cuando uno los necesita. En especial a Mati, Marco y Ana, por su amistad y nuestros grandes almuerzos en “la mesita”.

A todos los que permitieron, con su trabajo, que pueda hacer esta tesis: a Majo Gravisaco, por estar siempre disponible para aconsejarme y luchar con el citómetro; a Nacho Otero, por hacer posible el trabajo con cerdos; a Julia y Cristina por su ayuda y consejos con los experimentos con el confocal; a Silvio Díaz por su buena predisposición para ayudarme siempre en el bioterio; a Juan Schammas, Eze y Alfredo por su buena onda y por no olvidarme nunca adentro del P4; a Osvaldo Zabal y equipo (Diego, Marta y Luciana) por tener siempre unas MDBK aunque caiga a último momento; a todo el personal de apoyo del instituto: Fabián, Helena, Roxana.

A la FCEyN, por la calidad de educación de grado y posgrado que me brindó, en especial a mis profesores y a mis compañeros (y más que nada a los grandes amigos que me dejó la facu: Nico, Uli, Paye, Aro, Pau y Agus)

A mis amigos y hermanos de toda la vida, en especial a Favi, Emi R, Agus, Gita, Chapa, Lea, Ninho, Pachi, Andy, Henry, Lai, Magui, Emi H y Seba, que sé que siempre me acompañan (de cerca o desde lejos).

A toda mi familia, que siempre me acompañó, y en especial a mi tía Andrea y a mi abuela Beba que están siempre.

A Lu, mi amor y mi compañera, por hacerme tan pero tan feliz todos los días y bancarme en todas!

A Magui y Gupi, mis hermanitas, por todo el aguante y el amor que nos tenemos!

Muy especialmente a mis viejos, Claudia y Hernán, a quienes les debo mi carrera y siempre voy a agradecer por saber entenderme, acompañarme, bancarme y apoyarme tanto en todo esto. Son mucho más de lo que espero, mil gracias!

Por último, a mi país Argentina, por darme la oportunidad de estudiar y trabajar de lo que amo, y a todos los que luchan por la educación pública y la ciencia argentina.

“La ciencia, la técnica y la investigación son la base de la salud, bienestar, riqueza, poder e independencia de los pueblos modernos. Hay quienes creen que la investigación científica es un lujo o un entretenimiento interesante pero dispensable. Grave error, es una necesidad urgente, inmediata e ineludible para adelantar. La disyuntiva es clara, o bien se cultiva la ciencia, la técnica y la investigación y el país es próspero, poderoso y adelanta; o bien no se la practica debidamente y el país se estanca y retrocede, vive en la pobreza y la mediocridad. Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico tecnológico. Y los países pobres lo siguen siendo si no lo hacen. La ciencia no es cara, cara es la ignorancia.”

Dr. Bernardo Alberto Houssay

“La revolución industrial enseñó a fabricar riqueza y desde entonces la ciencia, aliada con la industria, se ha convertido en la principal fuente de poderío económico. En Latinoamérica distamos de aprovechar todas las posibilidades que brinda el conocimiento científico [...]. Pocas veces se planifica más allá de lo que dura un período político de gobierno. Lograr una estructura científica y tecnológica eficiente supone un trabajo de años que no se debe interrumpir. Si se destinan recursos solo cuando sobran y se suspenden cuando escasean los resultados serán nulos.”

Dr. Luis Federico Leloir

“Es que una política científica esclarecida es raramente prioridad política pues no trae riqueza ni bienestar a corto plazo. Peor aún, la buena investigación básica tampoco garantiza a largo plazo pues depende de una visión de largo alcance por parte de empresarios e industriales. Lo que sí está garantizado es que los países que no tomen el tren del desarrollo científico quedarán a merced de los demás.”

Dr. César Milstein

Abreviaturas

AcMNPV: *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus*

Ad5: Adenovirus serotipo 5

APC: del inglés, *antigen presenting cell*

BAC: del inglés, *bacterial artificial chromosome*

BEI: del inglés, *binary ethileneimine*

BEVS: del inglés, *Baculovirus Expression Vector System*

BMDC: del inglés, *bone marrow dendritic cells*

BP: buffer de permeabilización

BS: buffer *staining*

BV: del inglés, budded virion

cDC: del inglés, conventional dendritic cell

CLR: del inglés, *C type lectin receptor*

CMSPs: células mononucleares de sangre periférica

DAMPs: del inglés *damage associated molecular patterns*

DC: del inglés, *dendritic cell*

DO: densidad óptica

FA: Fiebre Aftosa

FMDV: del inglés, *Foot and Mouth Disease Virus*

IFM: Intensidad de Fluorescencia Media

IFN: interferón

IL: interleuquina

IRF: *IFN Regulatory Factor*

ISGs: del inglés, *interferon stimulated genes*

i.m: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

MHC: del inglés, *major histocompatibility complex*

moi: multiplicidad de infección

MR: del inglés, *mannose receptor*
NK: del inglés, *natural killer*
NPV: nucleopoliedrovirus
OB: del inglés, *occlusion body*
ODN: oligodesoxinucleótido
ODV: del inglés, *occlusion derived virion*
OVA: ovalbúmina
PAMPs: del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*
pDC: del inglés, *plasmacytoid dendritic cell*
PE: del inglés, *polyhedron envelope*
PECs: del inglés, *peritoneal exudate cells*
pif: del inglés, *per os infectivity factors*
PM: del inglés, *peritrophic matrix*
PRRs: del inglés, *pathogen recognition receptors*
RFc: Receptor de Fc
RIG-1: del inglés, *retinoic acid-inducible gene-1*
RLRs, del inglés, *RIG-I-like receptors*
SPF: del inglés, *specific pathogens free*
STING: del inglés *stimulator of interferon genes*
TCR: del inglés, *T cell receptor*
TLRs: del inglés, *Toll like receptors*
UFP: unidades formadoras de placas de lisis
VLPs: del inglés *virus like particles*
VSV: del inglés, *vesicular stomatitis virus*

Índice

Introducción	1
Los baculovirus	1
Características generales de los baculovirus	1
Estructura de los cuerpos de oclusión y los viriones de AcMNPV	3
Ciclo viral.....	5
Aplicaciones de los baculovirus en insectos	9
El sistema inmune de los mamíferos.....	10
Generalidades del sistema inmune	10
La respuesta inmune innata.....	11
Particularidades de la inmunología porcina	17
Los baculovirus y su interacción con los mamíferos	18
Los baculovirus en células de mamíferos.....	18
La respuesta inmune inducida por los baculovirus	19
Aplicaciones de los baculovirus en mamíferos	22
La fiebre aftosa.....	24
Generalidades de la enfermedad.....	24
El virus de la fiebre aftosa.....	24
La fiebre aftosa en cerdos.....	25
Situación de la enfermedad	26
Métodos de prevención y control de fiebre aftosa	29
Estrategias Antivirales estudiadas contra FMDV	30
Hipótesis.....	33
Objetivo General	1
Objetivos Específicos.....	1
Materiales y Métodos	1
Virus.....	36
Líneas celulares de lepidóptero	36
Líneas celulares de mamíferos	37
Ratones.....	37

Cerdos	38
Cepas bacterianas	38
Metodología del ADN recombinante	39
Minipreparaciones de ADN	39
Preparación de ADN plasmídico de alta calidad	39
Digestión con enzimas de restricción	39
Defosforilación de los extremos 5' fosfato	40
Electroforesis en geles de agarosa	40
Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	40
Reacciones de ligado molecular	40
Transformación de bacterias	41
Secuenciación de ADN	41
Construcción de BVs recombinantes	41
Síntesis de una construcción enriquecida en motivos CpG específicos para cerdos	41
Construcción de los vectores de transferencia pFBGVSV y pFBpCpG	42
Obtención de los bácmidos recombinantes	42
Obtención de los BV recombinantes	43
Preparación de stocks virales	43
<i>Stock</i> de BVs de AcMNPV	43
<i>Stock</i> de poliedros de AcMNPV	44
<i>Stock</i> de ODVs de AcMNPV	44
<i>Stock</i> de VSV	45
Cuantificación de los stocks virales	45
Titulación de virus infectivo por dilución a punto final	45
Cuantificación relativa de ODVs	46
Concentración de Ac-GVSV por ultracentrifugación	46
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	46
Identificación de proteínas mediante Western Blot	47
Electrotransferencia	47
Detección inmunológica de proteínas	47
Microscopía electrónica	48
Experimentos con DCs derivadas de médula ósea (BMDCs)	48
Producción de las BMDCs	48

Acidificación de BVs	49
Neutralización de BVs	49
Estudio de captura en BMDCs	49
Estudio de la maduración de BMDCs	49
Tratamiento de BMDCs con baculovirus para inmunofluorescencia.....	50
Inmunofluorescencia de BMDCs	50
Microscopía confocal	51
Experimentos con células mononucleares de sangre periférica de cerdos (CMSPs)	51
Purificación de las CMSPs.....	51
Tratamiento de las CMSPs con BVs.....	51
Determinación de células productoras de IFNs.....	52
Citometría de flujo	52
Ensayos para evaluar citoquinas	53
ELISA de IFN- γ e IL-6 murino.....	53
ELISA de IFN- α porcino.....	53
Bioensayos de actividad antiviral.....	54
Neutralización de IFN- α porcino.....	55
Depleción de células NK.....	55
Evaluación de la depleción de células NK	55
Inmunización de ratones con baculovirus	56
Desafío de ratones con FMDV	56
Inmunización y extracción de sangre en cerdos.....	57
Cuidado y uso de animales.....	58
Análisis estadísticos	58
Resultados	37
Desarrollo de técnicas para evaluar IFNs.....	59
Optimización de bioensayos de actividad antiviral:.....	59
Optimización de un ELISA para IFN- α porcino:.....	62
Estudio del rol del sistema inmune innato en la inducción del estado antiviral inducido por los BVs en ratones	64
Rol de los IFNs de tipo I en la inducción de un estado antiviral <i>in vivo</i>	64
Rol de las células NK en la inducción de un estado antiviral <i>in vivo</i>	67
Estudio de los factores virales determinantes para la inducción de una respuesta antiviral.....	71

Estudio de BV como vehículo de ADN en células inmunes	71
Purificación y caracterización de los viriones ocluidos	72
Evaluación de la capacidad de los ODVs para inducir actividad antiviral en ratones	74
Análisis comparativo del destino intracelular de BVs y ODVs	75
Estudio del rol de GP64 en la inducción de actividad antiviral por BVs en BMDCs	79
Búsqueda de un receptor candidato para GP64 en BMDCs	84
Estudio del impacto de los BVs en células porcinas	85
Estudio de la producción de interferones en CMSPs	86
Estudio de las células productoras de IFN- α en CMSPs	88
Estudio de las células productoras de IFN- γ en CMSPs	90
Evaluación del impacto de los BVs de AcMNPV en cerdos.....	92
Evaluación de la producción de IFNs en cerdos inoculados con BVs	92
Evaluación de la actividad antiviral contra FMDV en suero de cerdos inoculados con BVs ...	93
Generación de baculovirus recombinantes para la optimización de la inducción de actividad antiviral en cerdos	94
Construcción del plásmido de transferencia pFB-pCpG	95
Construcción del plásmido de transferencia pFB-GVSV	96
Obtención de los bácmidos recombinantes	96
Obtención de los baculovirus recombinantes	97
Expresión de la glicoproteína G de VSV	97
Estudio de la inducción de IFNs por Ac-pCpG.....	98
Estudio de la inducción de IFNs por Ac-GVSV	99
Discusión	60
Conclusiones	120
Anexo	122
Bibliografía	125

Introducción

Los baculovirus

Características generales de los baculovirus

Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) son virus que infectan artrópodos, principalmente insectos. Sus genomas consisten en una molécula de ADN doble cadena circular, de entre 80 y 180 kpb que codifica entre 90 y 180 genes [1-3]. De una variedad de más de 4000 genes, se ha identificado un set común de al menos 37 genes presentes en todos los genomas secuenciados [1, 2]. Estos genomas están empaquetados en nucleocápsides alargadas con extremos estructuralmente diferentes a las cuales hace referencia el nombre “baculovirus” (del latín “baculum”, bastón). Miden aproximadamente 300 nm de largo y 50 nm de diámetro, aunque el largo de la nucleocápside se puede acomodar al tamaño del genoma, permitiendo la construcción de genomas recombinantes que lleven grandes insertos [3, 4]. VP39 es la proteína mayoritaria de cápside y la más abundante de estos virus [5].

Se ha estudiado con profundidad la diversidad y la evolución de los baculovirus, y se encuentran secuenciados los genomas de aproximadamente 70 especies [3]. De esta manera, en base a la filogenia, al rango de hospedadores y a cómo se ocluyen sus viriones, la familia *Baculoviridae* se divide en cuatro géneros. Por un lado, los virus de lepidópteros están divididos en alfabaculovirus, que son nucleopoliedrovirus (NPVs), y betabaculovirus, conocidos como virus de la granulosis (GVs). Por otro lado, los gamabaculovirus y los deltabaculovirus, que también son NPVs, infectan himenópteros y dípteros, respectivamente [6, 7]. La especie más estudiada y que se ha convertido en especie modelo es el virus AcMNPV, un alfabaculovirus cuyo nombre deriva de *Autographa californica* (Ac), el hospedador del que fue aislado inicialmente. Sin embargo, AcMNPV es capaz de infectar una amplia variedad de especies de lepidópteros.

Los baculovirus regulan naturalmente el tamaño de las poblaciones de insectos, por lo que juegan un rol ecológico muy importante. En un principio, surgió interés por esta familia debido a la amenaza que significaban para la fabricación de seda, pero en las últimas décadas han tomado mayor relevancia por su utilización en todo el mundo como agentes para el control de plagas forestales y agrícolas, habiendo demostrado su efectividad contra decenas de hospedadores [2, 8, 9]. Actualmente, son muy utilizados como sistema de expresión de

proteínas [10, 11] y como vectores virales para el *delivery* de genes y terapia génica en vertebrados, entre otras aplicaciones [12-14].

El ciclo de vida de las especies más estudiadas de baculovirus, incluyendo el de AcMNPV, es bifásico, por lo que estos virus cuentan con dos tipos de viriones: los virus derivados de cuerpos de oclusión (ODVs, del inglés *occlusion derived viruses*) y los virus brotados (BVs, del inglés *budded viruses*) (Figura I1). Aunque contienen el mismo genoma y sus nucleocápsides son similares, estos dos fenotipos virales difieren en el origen y la composición de sus envolturas, así como en su rol en el ciclo viral. Además, los ODVs, que poseen varias nucleocápsides por partícula, se encuentran incluidos en la matriz de los cuerpos de oclusión (OBs, del inglés *occlusion bodies*), también llamados poliedros en NPVs, que los protegen físicamente del ambiente (Figura I1) [1-3].

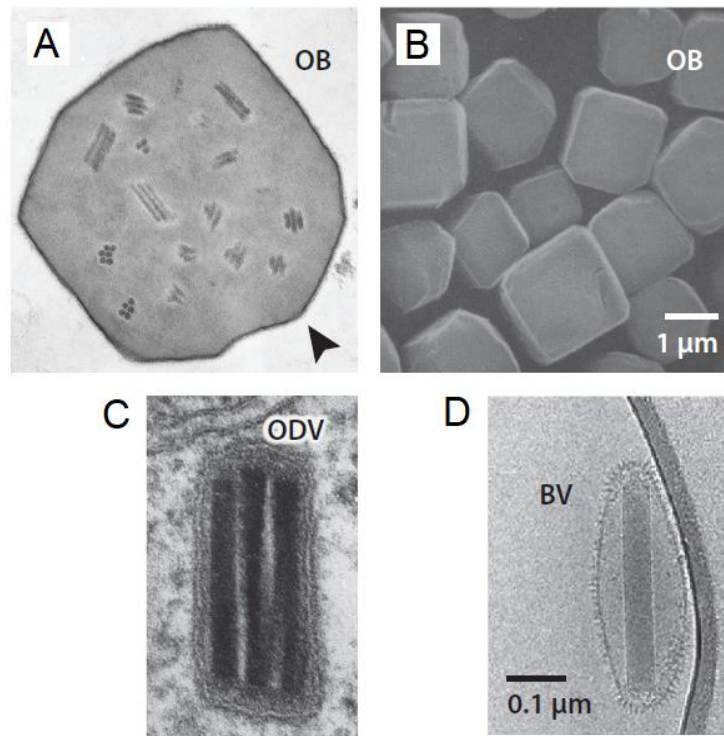


Figura I1. Microscopías electrónicas de AcMNPV. A. Microscopía electrónica de transmisión de un corte de cuerpo de oclusión maduro de AcMNPV mostrando ODVs incluidos con múltiples nucleocápsides por envoltura. Rodeando el poliedro hay una envoltura poliédrica o cáliz. B. Microscopía electrónica de barrido de poliedros de AcMNPV. C. Microscopía electrónica de transmisión de un corte mostrando la estructura detallada de un ODV. D. Criomicroscopía electrónica mostrando la estructura detallada del BV de AcMNPV incluyendo las glicoproteínas en la envoltura. *Figura adaptada de “Baculovirus Entry and Egress From Insect Cells”* [3].

Estructura de los cuerpos de oclusión y los viriones de AcMNPV

Los NPVs producen la enfermedad de lepidópteros conocida como poliedrosis que, como su nombre lo indica, genera cuerpos de oclusión con forma de poliedros de 0,6 a 2 μm de diámetro (Figura I1), fácilmente observables al microscopio óptico como cristales refráctiles en el núcleo de células infectadas [2]. Su matriz está conformada por una proteína denominada poliedrina, dentro de la cual se encuentran incluidos los ODVs. Los cuerpos de oclusión son altamente estables y son capaces de resistir las condiciones ambientales normales, preservando los viriones ocluidos. Alrededor de los poliedros hay una envoltura llamada PE (del inglés *polyedron envelope*) compuesta por la proteína PE o Ac131 en asociación con estructuras fibrilares de la proteína p10 [15-18].

Los ODVs de AcMNPV están organizados en múltiples agregados de nucleocápsides (1 a 15) dentro de una envoltura que deriva de la envoltura nuclear [19, 20]. La envoltura de los ODVs es muy compleja, más que la de los BVs, con al menos 13 proteínas virales integrales de membrana (Figura I2) [3].

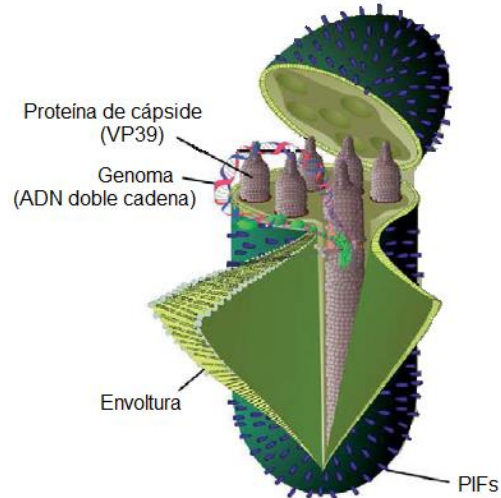


Figura I2. Estructura de los viriones ocluidos de AcMNPV. Modelo de la estructura del ODV de AcMNPV. El genoma de ADN es mostrado expandiéndose de una nucleocápside para enfatizar la presencia de un genoma viral en cada nucleocápside. Las proteínas PIFs (del inglés *“per os infectivity factors”*) se muestran en la envoltura. *Figura modificada de “The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function”* [1].

Por otro lado, la envoltura de los BVs deriva de la membrana plasmática por la que brotan (Figura I3). Una de las tres proteínas más abundantes que se encontraron asociadas a los BVs de AcMNPV es GP64 (Ac128) [5], una glicoproteína de envoltura exclusiva de este fenotipo que está presente en los extremos del virión formando homotrímeros en estructuras denominadas peplómeros. Pertenece a la familia de proteínas de fusión de envoltura de clase III que se activan a pH ácido y se caracterizan por no requerir clivaje. Posee un dominio de fusión interno, un dominio troncal próximo a su intercalación en la membrana y un dominio ancla carboxi-terminal [21]. En el tránsito por el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, GP64 adquiere N-glicosilaciones. La delección de su gen en AcMNPV resulta en virus que replican pero no son capaces de brotar ni de infectar células [22, 23].

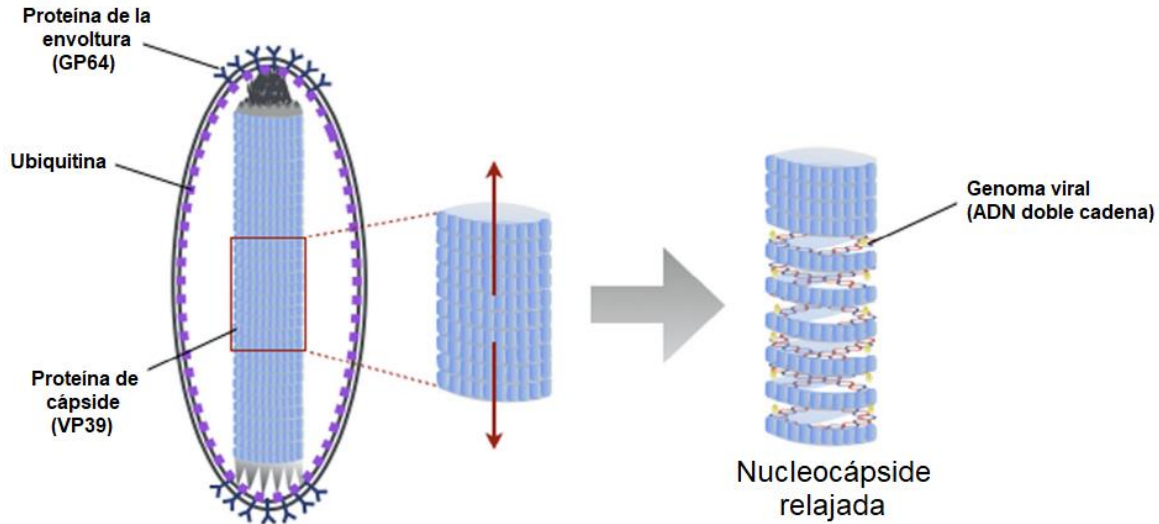


Figura I3. Estructura de los viriones brotados de AcMNPV. Modelo de la estructura del BV de baculovirus AcMNPV. La proteína mayoritaria de envoltura GP64 está distribuida en los polos de la envoltura. El genoma de ADN está condensado y superenrollado en la nucleocápside. La cápside está formada por la proteína mayoritaria VP39, que forma una estructura en espiral. *Figura modificada de “Budded Baculovirus Particle Structure Revisited”* [24].

Ciclo viral

El ciclo comienza cuando la larva ingiere materia vegetal contaminada con cuerpos de oclusión. El intestino medio de los insectos tiene, además de enzimas digestivas, un gradiente de pH que alcanza un valor de entre 10,0 y 12,0 en la región central [25]. Estos valores de pH están entre los más altos que se puede encontrar en sistemas biológicos y causan la disolución de los cuerpos de oclusión, liberando a los ODVs. Allí, la primera barrera con la que se encuentran es la matriz peritrófica (PM), compuesta por quitina, mucopolisacáridos y proteínas, que es superada por distintos mecanismos dependiendo de la especie. Los ODVs son capaces de infectar las células cilíndricas epiteliales, el tipo celular con mayor presencia en el intestino medio, por fusión directa de su envoltura con la membrana plasmática de las microvellosidades, iniciando de esta manera la infección de la larva [2, 3].

Los ODVs contienen 10 proteínas asociadas a la envoltura que son requeridas para la infectividad oral en larvas. Los genes que codifican estas proteínas exclusivas del fenotipo

ODV son conocidos como genes *pif*, y tienen homólogos conservados en todos los genomas de la familia *Baculoviridae* [26]. Las proteínas PIF forman un complejo de alto peso molecular en la envoltura del ODV que es funcional en un medio rico en proteasas y extremadamente alcalino como el intestino medio de la larva. Incluso, la formación y estabilidad de este complejo es necesaria para la resistencia del virión a la degradación proteolítica. Se postula que estas proteínas cumplen distintos roles en la adhesión y la entrada del virión a la célula, pero los mecanismos aún no están esclarecidos [3]. Sin embargo, se sugiere que el ODV se adhiere a un receptor proteico desconocido en la membrana de las microvellosidades, debido a que este proceso es saturable y sensible al pretratamiento de las células con proteasas [26, 27]. Una vez que ingresaron al citoplasma, las nucleocápsides deben alcanzar el núcleo, donde se desnuda su ADN y comienza la replicación y la expresión de los genes virales. En la membrana plasmática de las regiones basal y lateral de estas células se forman parches de glicoproteína GP64, que son necesarios para que los BVs originados broten hacia el hemocele y lleven a cabo las infecciones secundarias en el resto de los tejidos [23].

GP64, además de ser requerida para la brotación, está involucrada en la infección de nuevas células, como ya se mencionó [22, 28, 29]. La entrada de los BVs se produce por endocitosis mediada por la interacción de GP64 con un receptor aún no identificado, aunque se sostiene que es posible que no haya un receptor específico y que se una a fosfolípidos ácidos en la membrana plasmática [30]. Esto explicaría su capacidad para facilitar la entrada de AcMNPV en una variedad tan amplia de tipos celulares durante la infección sistémica. Los viriones adsorbidos a la superficie son internalizados en vesículas endocíticas recubiertas de clatrina [31]. A continuación, estos endosomas se acidifican y se produce la formación de un poro formado por un complejo de 10 trímeros de GP64, que permite el escape de la nucleocápside al citoplasma [3, 32]. Allí, son transportadas hacia el núcleo celular e incluso ingresan a través del complejo del poro nuclear mediante la polimerización de actina [33-35].

La nucleocápsides recién ensambladas brotan del núcleo obteniendo una envoltura derivada de la membrana nuclear que se pierde durante el tránsito a través del citoplasma [36]. Se ha postulado que las nucleocápsides se dirigen a la membrana celular por polimerización de actina, de manera similar a cómo ingresan al núcleo [34, 35]. Sin embargo, también se ha sugerido que son transportadas a lo largo de los microtúbulos, ya que kinesina

1, proteína motora citosólica que media el transporte intracelular anterógrado sobre los microtúbulos, tiene secuencias conservadas que interactúan con VP39 y EXON0, una proteína asociada a la cápside [37].

Las nucleocápsides ensambladas más tardíamente parecen estar destinadas a permanecer en el núcleo, dar lugar a los ODVs y ocluirse. Estos viriones obtienen su envoltura a partir de microvesículas que derivan de la membrana interna nuclear, modificada con proteínas virales [1, 38].

En la etapa final de la replicación de baculovirus, muchos genes muy tardíos son hiperexpresados (transcriptos por una ARN-polimerasa codificada por el virus) resultando en la producción de altos niveles de poliedrina y p10. Poliedrina se acumula en el núcleo y cristaliza, embebiendo los ODVs, mientras que p10 participa en la formación de la envoltura PE, aunque todavía no están claros los detalles de estos procesos [2, 3]. Los poliedros formados son liberados al ambiente cuando el insecto muere y se desintegra (ciclo completo en Figura I4).

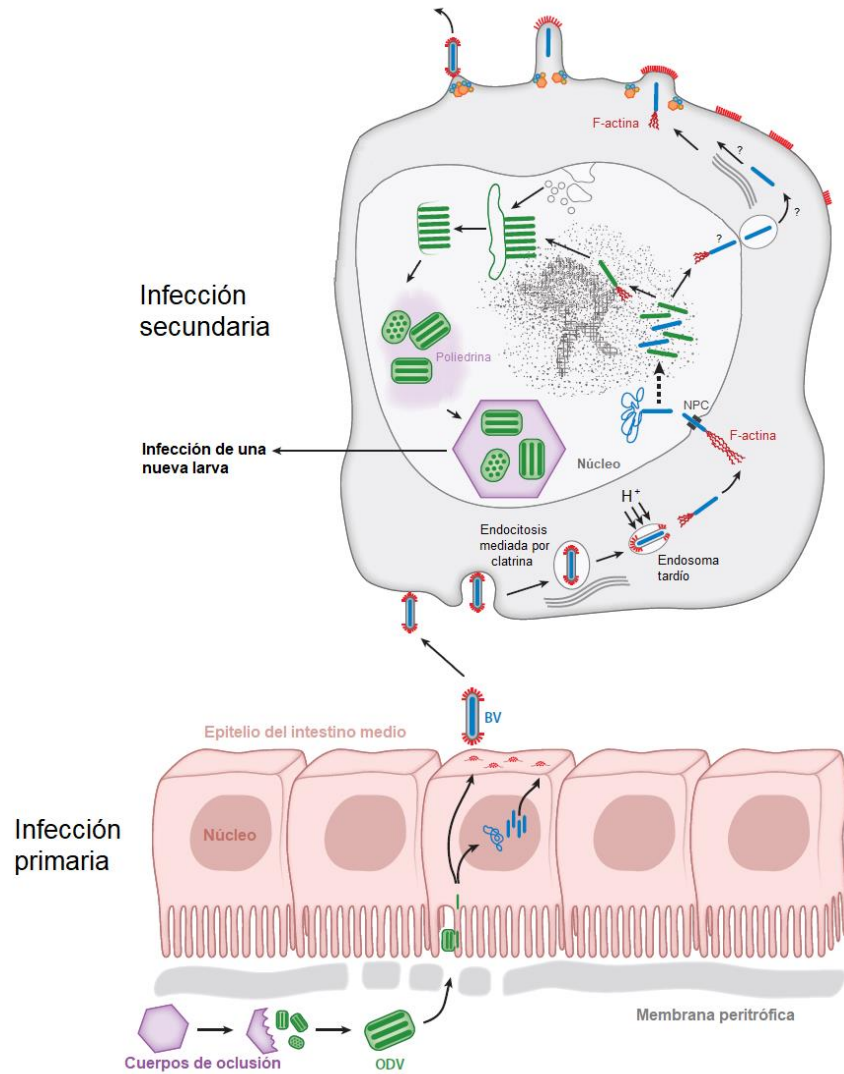


Figura I4. Ciclo de vida de los baculovirus. Cuando una larva de insecto ingiere los cuerpos de oclusión, se disuelven en el intestino medio liberando los ODVs. Estos viriones son capaces de infectar las células epiteliales del intestino medio (infección primaria). Los viriones recién formados brotan por la membrana basal, envolviéndose con la misma para conformar los BVs, y comienzan la infección sistémica (Infección secundaria). En las etapas tempranas se producen más BVs, que se encargan de propagar la infección, mientras que en las etapas más tardías se producen ODVs, que se ocluyen en los poliedros. Cuando la célula muere los cuerpos de oclusión son liberados al ambiente. *Figura modificada de Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells [3].*

Aplicaciones de los baculovirus en insectos

Los baculovirus históricamente han despertado gran interés en el área de la producción agrícola por su aplicación como biopesticidas. Son agentes seguros tanto para los humanos como para otros animales, lo cual implica una ventaja frente al uso de insecticidas químicos. Numerosos trabajos han demostrado la efectividad de estos virus contra decenas de hospedadores [2, 8, 9]. Sin embargo, la aceptación y el uso de estos virus para el control de plagas forestales y agrícolas han sido limitados. Esto se puede atribuir a que la velocidad para matar al insecto es baja, la gama de hospedadores de cada virus es limitada y su producción conlleva algunas dificultades técnicas. En el último tiempo se han desarrollado una gran variedad de virus recombinantes, diseñados para reducir el tiempo que se necesita para matar a los insectos susceptibles mediante la inclusión de toxinas, hormonas o enzimas dentro de los cuerpos de oclusión, pero estos desarrollos también se enfrentan a la resistencia de muchos países a la utilización de organismos genéticamente modificados [39, 40].

Otra aplicación importante de estos virus es su utilización para expresar proteínas recombinantes en células de insectos. El sistema de expresión por baculovirus (BEVS, del inglés *Baculovirus Expression Vector System*) es una herramienta muy valiosa y versátil debido a que da lugar a proteínas solubles y funcionalmente activas en la mayoría de los casos. Esto se debe a que se trata de un sistema eucariota, por lo que las proteínas expresadas suelen plegarse correctamente y sufren las modificaciones postraduccionales correspondientes [10, 41].

En este sistema se suele reemplazar el gen de poliedrina del genoma de baculovirus, necesario sólo para la transmisión horizontal del virus, por un gen heterólogo [42]. La proteína poliedrina, componente mayoritario de los cuerpos de oclusión, se acumula durante la fase muy tardía de la infección, pudiendo alcanzar un 30 a 50 % de las proteínas totales de la célula infectada, por lo que el empleo de su promotor es ideal para la expresión de genes heterólogos. La inactivación por delección o inserción en el locus poliedrina resulta en la producción de baculovirus con fenotipo “cuerpos de oclusión negativos”. Posteriormente, siguiendo la misma lógica, comenzó a emplearse el promotor del gen de la proteína de expresión muy tardía p10 para guiar la transcripción de genes heterólogos [10, 42, 43].

Durante más de 35 años de uso de este sistema se realizaron numerosas mejoras tecnológicas en cuanto a vectores de transferencia, identificación y aislamiento de virus

recombinantes, métodos de cuantificación y cultivo celular [10, 43]. En 1993 se desarrolló el “sistema bÁcmido”, que permite la generaci3n de genomas de baculovirus AcMNPV recombinantes en *Escherichia coli* (*E. coli*). En este m3todo se realiza una recombinaci3n sitio especÍfica en el locus poliedrina mediante un cromosoma artificial bacteriano (BAC, del ingl3s “*bacterial artificial chromosome*”) que porta la secuencia entera del genoma de AcMNPV. Este bÁcmido puede luego ser transfectado en c3lulas de insectos para generar BVs, proceso que ha simplificado enormemente el procedimiento de generar baculovirus recombinantes [10].

Finalmente, una ventaja adicional de BEVS es que las larvas de insectos susceptibles pueden ser utilizadas como “biofÁbricas” para la producci3n de proteÍnas recombinantes, reduciendo el costo de la producci3n e incrementando el rendimiento. De esta manera, se ha dado lugar a un sistema de expresi3n basado en virus que es seguro, versÁtil, fÁcil de usar y es posible llevar a mayor escala [41, 43].

El sistema inmune de los mamÍferos

Generalidades del sistema inmune

La respuesta inmune contra pat3genos integra mecanismos propios de la inmunidad innata, que actúa desde el comienzo de la infecci3n, y de la inmunidad adaptativa, que requiere varios dÍas para iniciar sus mecanismos efectores. Tradicionalmente, el control de las enfermedades infecciosas se llev3 a cabo mediante la utilizaci3n de vacunas. Éstas desarrollan inmunidad adaptativa y se basan en el concepto de la memoria inmunol3gica, es decir, en la capacidad del sistema inmune para responder con mayor velocidad y vigor ante un reencuentro con el mismo pat3geno. Actualmente tambi3n reconocemos la importancia de la respuesta inmune innata y, en especial, de las c3lulas dendrÍticas (DCs, del ingl3s “*dendritic cells*”) en el 3ptimo desarrollo de respuestas inmunes especÍficas y en el desarrollo de inmunoterapias. AsÍ como las c3lulas T y B reconocen epÍtopos antig3nicos mediante receptores especÍficos, las c3lulas de la inmunidad innata reconocen ciertas estructuras presentes en los pat3genos llamadas patrones moleculares asociados a pat3genos (PAMPs, del ingl3s *pathogen-associated molecular patterns*). El reconocimiento de los PAMPs se da

por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs del inglés “*pattern recognition receptors*”) presentes en la superficie celular, en vesículas endocíticas y en el citoplasma. Un ejemplo de ellos son los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptor*), cuyos ligandos son potentes inmunomoduladores debido a la señalización que desencadenan.

Las DCs constituyen una población celular heterogénea, pudiendo distinguirse principalmente entre células dendríticas convencionales (cDCs, del inglés “*conventional dendritic cells*”) y células dendríticas plasmocitoides (pDCs, del inglés “*plasmacytoid dendritic cells*”). Además de diferir completamente en sus funciones, las cDCs se caracterizan fenotípicamente por ser CD11c⁺ CD123⁻ y las pDCs CD11c⁻ CD123⁺. Durante una infección, las cDCs inmaduras se encuentran en la periferia sensando el ambiente a través de PRRs. Tienen una alta capacidad endocítica y macropinocitan grandes cantidades de líquido y solutos. Cuando son activadas por PAMPs, comienzan a madurar produciendo citoquinas e incrementando su capacidad como células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *antigen-presenting cells*). La naturaleza de la señal determinará qué citoquinas van a producirse y, por lo tanto, el tipo de respuesta que se va a iniciar, siendo este elemento en particular el que condiciona el tipo, la fuerza y la duración de la respuesta adaptativa. Las cDCs maduras disminuyen su capacidad de internalizar proteínas extracelulares, aumentan la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica y se dirigen a los nódulos linfoides para presentar antígenos a las células T. Las cDCs son capaces de procesar reguladamente los antígenos de patógenos capturados y cargar los péptidos resultantes en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) o de clase II (MHC II) para presentárselos a los linfocitos T. La maduración de las cDCs es un prerrequisito para la activación de los linfocitos T y la iniciación de una respuesta adaptativa [44].

La respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata comprende la acción mediada por un amplio conjunto de poblaciones celulares que incluyen no sólo diferentes poblaciones de leucocitos, sino también las propias células epiteliales, las células endoteliales y las células parenquimatosas propias de los diferentes tejidos, y también por mediadores humorales como el sistema de

complemento. Las células de la inmunidad innata reconocen los PAMPs de los microorganismos a través de los PPRs. Estos pueden tener estructuras químicas muy diversas, pudiendo tratarse de lípidos, hidratos de carbono, proteínas, lipoproteínas, glucoproteínas o ácidos nucleicos microbianos. Sin embargo, todos los PAMPs están presentes en patógenos pero no en sus hospedadores y son esenciales para la supervivencia o la patogenicidad del microorganismo; además, en general se tratan de estructuras compartidas por numerosos microorganismos.

Existen varias familias de PPRs, que difieren en su estructura y patrón de expresión, en los PAMPs que reconocen y en las funciones que inducen al activarse. Ciertos PPRs también reconocen señales de daño tisular o DAMPs (del inglés *danger-associated molecular patterns*), captando la existencia de un proceso infeccioso. Además, las células de la inmunidad innata expresan receptores para quimiocinas y citoquinas, receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas (RFc), receptores para componentes activados del sistema de complemento y receptores para péptidos formilados bacterianos. Al decodificar las propiedades de los patógenos con sus receptores, las células de la inmunidad innata pueden actuar rápidamente para erradicar el foco infeccioso o contener su desarrollo hasta que los mecanismos propios de la inmunidad adaptativa sean operativos. Además, las células dendríticas y otros componentes de la inmunidad innata orientan el curso y el perfil de la inmunidad adaptativa [44].

Frente a una infección con un patógeno, se reclutan leucocitos al seno del tejido infectado. Los neutrófilos acuden rápida y masivamente al foco infeccioso y su función es fagocitar y destruir a los microorganismos a través de mecanismos oxidativos y no oxidativos. Por otro lado, los macrófagos se originan a partir de monocitos circulantes que extravasan a tejidos y, además de tener las mismas funciones que los neutrófilos, son APCs profesionales y producen diversas citoquinas y quimiocinas que orientan la respuesta inmune. Pueden diferenciarse en un perfil clásico, productor de citoquinas inflamatorias, o un perfil alternativo, productor de las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β . Los neutrófilos y los macrófagos son fundamentales para combatir infecciones bacterianas y fúngicas.

Las células *natural killer* (NK) son linfocitos que cumplen una función destacada como primera línea de defensa contra tumores y patógenos microbianos. Sus funciones efectoras se basan en su capacidad de secretar citoquinas y quimiocinas (principalmente IFN-

γ , pero también TNF- α , GM-CSF, CCL3, CCL4, y CCL5) y en su capacidad citotóxica contra células infectadas o tumorales. Pueden distinguir células normales de células infectadas o neotransformadas a través de un fino balance en la señalización activada por receptores activadores e inhibidores en su superficie. Todas las células NK se originan en la médula ósea a partir de un progenitor linfoide común. Una vez maduras, circulan por la sangre y migran a los órganos linfoides secundarios o a tejidos durante un proceso infeccioso, donde llevan a cabo sus funciones.

Existe un complejo diálogo recíproco establecido entre las células NK con las DCs, los macrófagos e incluso los neutrófilos, tanto en los ganglios linfáticos como en la periferia, que promueve la activación de estas células y el desarrollo de las respuestas Th1. Este diálogo es mediado por factores solubles como citoquinas y por interacciones célula-célula. De esta manera, las células NK, a pesar de ser consideradas células de la inmunidad innata, participan en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Además, en los últimos años se les describieron características típicas de la inmunidad adaptativa, como la expansión de células patógeno-específicas, la generación de células de memoria y la posibilidad de inducir una respuesta secundaria de mayor potencia [44-46].

También existen células T no convencionales que actúan tempranamente en procesos infecciosos y tienen propiedades tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Las células T $\gamma\delta$, que expresan como receptor de células T (TCR) el heterodímero $\gamma\delta$, actúan en la fase temprana de infecciones en mucosas captando señales de estrés tisular a través de su TCR y del receptor NKG2D. También se activan por el entorno de citoquinas y dan una respuesta citotóxica y de producción de citoquinas. Por otro lado, existen células T “*natural killer*” (NKT), que reconocen glicolípidos antigénicos presentados por APCs a través de las proteínas CD1. La activación de estas células lleva a una rápida respuesta en base a su capacidad citotóxica y a su capacidad de secreción de citoquinas y quimiocinas.

Específicamente, las infecciones causadas por virus tienen un gran impacto en la salud humana y veterinaria. Pueden cursarse en forma aguda y resolverse rápidamente, o también pueden cursarse como infecciones persistentes. Diferentes familias de PPRs median el reconocimiento de virus por parte de las células de la inmunidad innata, como por ejemplo las familias de receptores RIG-1 (del inglés “*retinoic acid-inducible gene-1*”) (RLRs, del inglés “*RIG-I-like receptors*”) y receptores de tipo NOD (del inglés “*nucleotide-binding*

oligomerization domain") (NLRs, del inglés "*NOD like receptor*") que se expresan en el citosol. La activación de los RLRs tras reconocer ARN viral en diferentes tipos celulares conduce a la producción de los IFNs de tipo I. Un sensor de ADN citosólico recientemente descrito que participa en las respuestas inmunes antivirales es el GMPAMP cíclico (cGAMP) sintetasa (cGAS) que induce la producción de IFNs y otras citoquinas a través de la producción del segundo mensajero cGAMP que activa al adaptador STING (del inglés "*stimulator of interferón genes*") (Chen 2016, Li, Chen 2018) [47] [48]. También cabe mencionar a los receptores de lectinas de tipo C (CLR, del inglés "*C-type lectin receptors*"), que reconocen motivos presentes en los hidratos de carbono virales, pero ausentes en los hidratos de carbono del hospedador (particularmente, motivos ricos en manosa, fucosa y β -glucano). Los TLR también participan en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales e inducen una fuerte respuesta inmune innata con secreción de grandes cantidades de IFNs de tipo I. TLR3 reconoce ARN viral doble cadena y TLR7 de cadena simple, mientras que TLR9 reconoce fragmentos de ADN que contienen motivos CpG no metilados [44].

En la respuesta inmune innata antiviral participan las cDCs y los macrófagos, así como también las células NK. Estas últimas son fundamentales por su rol como productoras de IFN- γ y su capacidad citotóxica frente a células infectadas. También participan las pDCs, que se activan principalmente a través de los TLR7 y TLR9 para cumplir con su función principal que es producir niveles extremadamente altos de IFNs de tipo I, además de algunas citoquinas pro-inflamatorias (Figura I5).

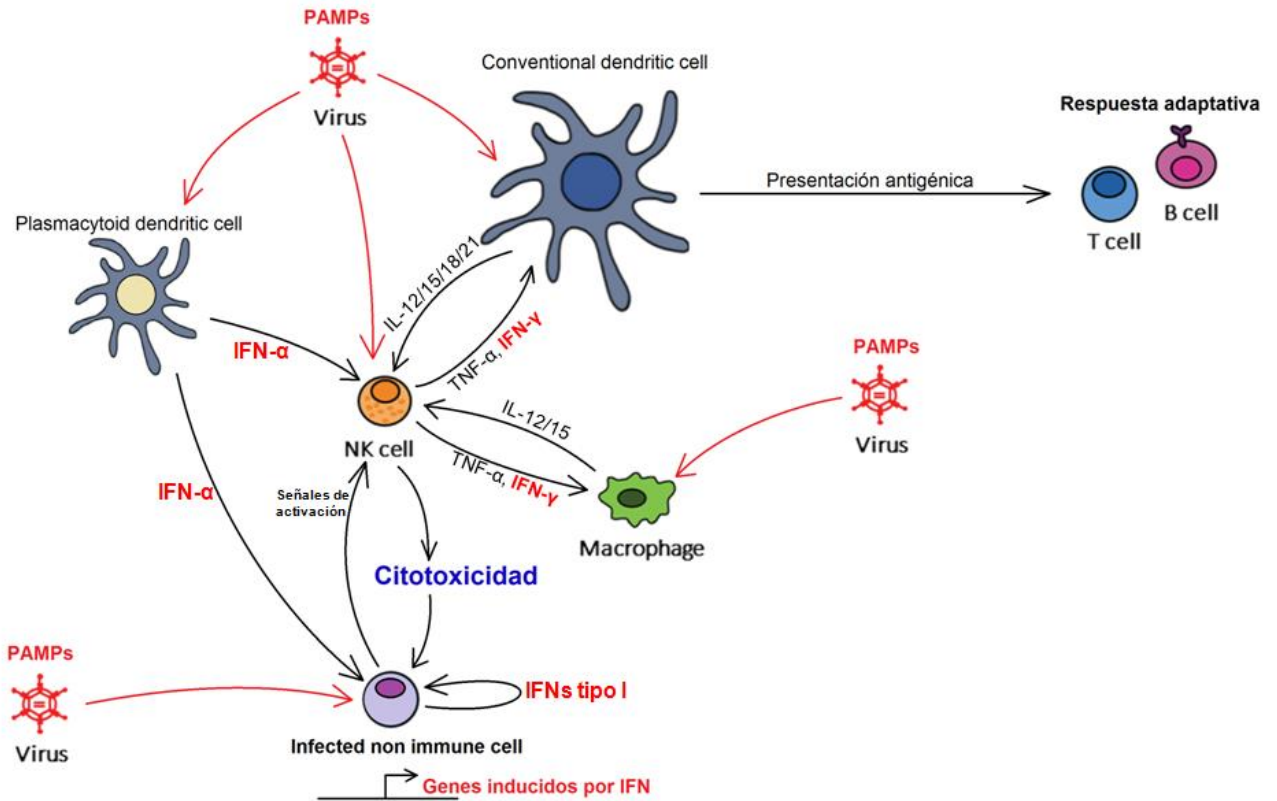


Figura 15. Esquema de la respuesta inmune innata antiviral. Los PAMPs presentes en los virus son reconocidos por PPRs de las células inmunes y no inmunes de mamíferos. Es de esta forma en que las DCs, los macrófagos y las células NK son activadas, y comienzan a producir citoquinas inflamatorias, IFNs y, en el caso de las células NK, inician su rol citotóxico contra células infectadas. El diálogo de citoquinas entre las células NK y las DCs y macrófagos es fundamental para la activación completa de estas células. Los IFNs de tipo I expresados por células inmunes y no inmunes, cumplen un rol clave en esta respuesta. Su acción se da de forma autócrina y parácrina a través del receptor para IFNs tipo I, induciendo la expresión de estos IFNs en un bucle de retroalimentación positiva e induciendo la expresión de genes relacionados con la protección de células contra infecciones virales. El contexto de citoquinas producido y la presentación antigénica llevada a cabo por las DCs inicia y modula la respuesta inmune adaptativa.

Los IFNs son proteínas con fuertes efectos antivirales y constituyen los principales mediadores en la inmunidad frente a infecciones virales. En base a sus características genéticas, estructurales y funcionales, así como a sus receptores en la superficie de las células, fueron clasificados en tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω , IFN- κ , IFN- δ , IFN- τ y IFN- ζ), tipo II (IFN- γ) y tipo III (IFN- λ) (Figura 16). Ejercen, por otra parte, potentes acciones antiproliferativas e inmunomoduladoras [49]. Todos los miembros de la familia de IFNs de

tipo I comparten el mismo receptor en la superficie celular, que consta de dos subunidades (IFNAR1 e IFNAR2). Además, tienen el mismo mecanismo de acción y llevan a la expresión de los genes estimulados por interferón (ISGs del inglés *interferón stimulated genes*). De esta manera, se induce la expresión de centenares de proteínas cuya acción bloquea la infección y la replicación viral en distintos pasos. Por lo tanto, los IFNs de tipo I median una poderosa acción antiviral no sólo en las células ya infectadas, sino también en las células vecinas [49].

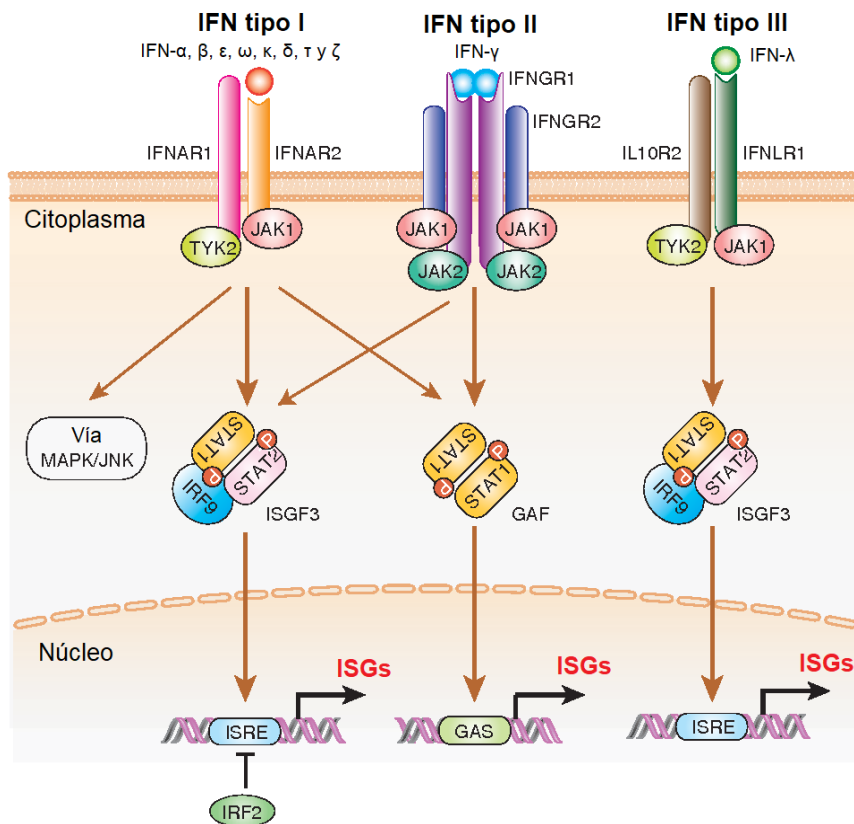


Figura I6. Vías de transducción de señales de los receptores de los IFNs tipo I, II y III. Esquema de las vías de transducción de señales para los tres tipos de IFNs. La interacción con los IFNs con sus receptores inicia cascadas de señales que conducen a la expresión de ISGs, *Figura adaptada de “The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family”* [50].

Por otro lado, los virus han desarrollado durante su evolución numerosos mecanismos para evadir la respuesta inmune. Muchos de ellos expresan proteínas que interfieren en la actividad de citoquinas, pueden inhibir la actividad de las células inmunes e incluso llegan a modular la apoptosis de la célula hospedadora.

Particularidades de la inmunología porcina

La inmunología porcina es un área de creciente interés debido no sólo a la necesidad de mejorar la efectividad de terapias y vacunas contra enfermedades veterinarias sino también a su uso como modelo de numerosas enfermedades infecciosas virales y bacterianas humanas, su utilidad para estudios de inmunoterapia y vacunología y su aplicación en xenotransplantes [51]. Si bien existen muchos puntos en común con la inmunología humana e incluso con la murina, tienen varias particularidades a tener en cuenta.

Con respecto a las DCs porcinas, se hallaron en sangre periférica células que fueron llamadas cDCs1, equivalentes a las DCs CD11b murinas y a las DCs CD1c humanas. Otras células, en base a su fenotipo, fueron propuestas como cDCs2 y son equivalentes a las CD8 α DCs en ratones, caracterizadas en la mayoría de las especies por ser CD172a⁻. También hay una población de células originalmente llamadas “células naturalmente productoras de IFNs”, que son funcionalmente equivalentes a las pDCs de otras especies, aunque varíen sus características fenotípicas. Por otra parte, en mucosas, piel y distintos órganos de cerdos se hallaron numerosas poblaciones de células con características fenotípicas y funcionales de DCs, pero con sus particularidades, que deben ser estudiadas en mayor profundidad [52, 53].

En cuanto a RRP, en porcinos se hallaron genes expresando todos los TLRs conocidos en humanos, mostrando una homología nucleotídica del 65-77% con los ortólogos humanos. También se logró clonar el gen que codifica el polipéptido MyD88 en cerdos, que resultó ser 87% homólogo al gen de MyD88 humano [54]. Auray y colaboradores estudiaron las DCs y monocitos de sangre periférica porcina y detectaron, en líneas generales, niveles de expresión importantes de los TLR y de proteínas relacionadas con las vías de activación dependientes de sensores de ácidos nucleicos citosólicos. Las cDCs del sistema inmune porcino son muy eficientes presentadoras de antígenos mientras que las pDCs parecen tener un rol crítico en la producción de citoquinas y dan, de esta manera, una “tercera señal” para la inducción de respuestas de células T vírgenes [53].

Las células NK porcinas no pudieron ser descriptas con un único marcador. Si bien se han descripto hasta el momento numerosas características fenotípicas, se las puede distinguir de otras poblaciones como linfocitos CD3⁻, al igual que las células B, pero CD8 α ⁺.

En cuanto a la proporción de células NK en cerdos, los trabajos realizados concluyen que es muy heterogénea y depende del individuo [55]. Recientemente se demostró que las células NK porcinas tienen características de APCs, al igual que se vio en humanos, pueden internalizar antígenos de células diana, expresar moléculas de MHC II y CD80/86, en particular luego de ser activadas por IL-2/IL-12/IL-18, y son capaces de estimular la proliferación de células T [56].

En cuanto a las particularidades en los linfocitos T, hay que destacar que en cerdos hay un importante número de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ doble positivos, y los trabajos publicados hasta el momento sugieren que son una población de células T colaboradoras activadas y/o de memoria. En porcinos también se detectaron células NKT expresando CD1d, con características y subpoblaciones únicas, pero con similitudes a las humanas en cuanto a frecuencia, distribución tisular y fenotipo [57]. Además, en cerdos al igual que en otras especies de animales, hay una proporción sustancial de células T $\gamma\delta$ en circulación, que aumenta en número absoluto y relativo junto con la edad del animal (15-50% de los linfocitos de sangre periférica), sugiriendo que juegan un rol más importante en la inmunidad del que se conocía. Además de sus funciones clásicas, se describió que una población minoritaria de células T $\gamma\delta$ tiene características de APC debido a que posee alta capacidad endocítica, expresa MHC II y moléculas coestimuladoras, y es capaz de presentar antígenos a células T $\alpha\beta$ [55, 58].

Los baculovirus y su interacción con los mamíferos

Los baculovirus en células de mamíferos

Aunque sólo replican en células de insectos, los BVs de AcMNPV son capaces de ingresar en una amplia variedad de células de vertebrados. Este proceso es mediado por la proteína GP64, pero no está claro cuál o cuáles son los receptores celulares involucrados [14]. Algunos autores sugieren que el sindecano-1, miembro de los heparan sulfato proteoglicanos, tiene un rol en la adsorción previa a la entrada en células de mamíferos [59, 60]. También se propuso que el BV interactúa con los fosfolípidos de la superficie celular [61]. Una vez adsorbidos a la célula, los BVs son internalizados a través de “*lipid rafts*”

(balsas lipídicas) de la membrana plasmática de las células de mamíferos [62] e ingresan mediante endocitosis dependiente de clatrina y/o de dinamina, aunque también lo pueden hacer por macropinocitosis. Por lo tanto, la vía de entrada puede variar dependiendo del tipo celular [31, 63]. Luego de la internalización y de la maduración de la vesícula endocítica, el BV fusiona su envoltura con la membrana endosomal a causa del cambio conformacional que sufre GP64 a pH ácido, de manera similar a lo que ocurre en células de insecto [31, 62, 64, 65]. Las nucleocápsides de BVs en el citoplasma inducen la formación de filamentos de actina que facilitan la importación al núcleo [66], mientras que, contrariamente, los microtúbulos constituirían una barrera durante este transporte [64]. Una vez allí, la cápside de los BVs entra por los poros de la envoltura nuclear independientemente del estadio del ciclo celular, es decir que no requiere del desensamblaje de las membranas nucleares [34, 66]. Un dato llamativo es que se lograron detectar algunos transcritos sintetizados a partir del genoma de AcMNPV en células de mamíferos infectadas [67]; sin embargo, hasta el momento no hay evidencias de expresión funcional de genes virales.

Los ODVs, por otro lado, si bien pueden ingresar en células de vertebrados, lo hacen con una eficiencia muy inferior a la de los BVs y quedan restringidos a la periferia celular, no siendo capaces de alcanzar el núcleo [68, 69]. No se conoce la vía de entrada de este fenotipo en células de mamíferos. Sin embargo, se detectaron cantidades similares de nucleocápsides en citoplasma al tratar líneas celulares de origen humano con ODVs a 4 °C o a 28 °C, por lo que se postula que el ingreso ocurre por fusión directa de membrana [69].

La respuesta inmune inducida por los baculovirus

Los BVs de AcMNPV inducen una fuerte respuesta inmune innata en ratones, estimulando la producción de altos niveles de IFNs y citoquinas pro-inflamatorias que alcanzan su máxima expresión en plasma entre las 3 y las 8 horas post-inmunización [70, 71]. Debido a que no están adaptados a la infección en mamíferos, los baculovirus no han desarrollado evolutivamente mecanismos de evasión del sistema inmune. Su genoma de ADN parece ser el responsable de activar, a través de PPRs, la respuesta inmune innata. La frecuencia de motivos CpG en el genoma de los baculovirus es significativamente mayor que en el genoma de mamíferos y similar a la de *E. coli* y a la del virus del herpes simple y activan

la producción de citoquinas proinflamatorias en células inmunes a través de la vía de señalización dependiente del receptor TLR9 y de MyD88. Por otro lado, la inducción de IFNs de tipo I puede darse por distintas vías dependiendo del tipo celular (Figura I7). Mientras que en DCs plasmocitoides también es promovida por la vía dependiente de TLR9, la producción de IFNs de tipo I en DCs convencionales depende de STING e IRF7, mientras que en células no inmunes depende de STING, TBK1 e IRF3. También hay evidencias de la participación de la vía dependiente de IPS-1 en células no inmunes [71-75]. Son necesarios más estudios para comprender la compleja red de vías de señalización activadas por los baculovirus en los distintos tipos celulares.

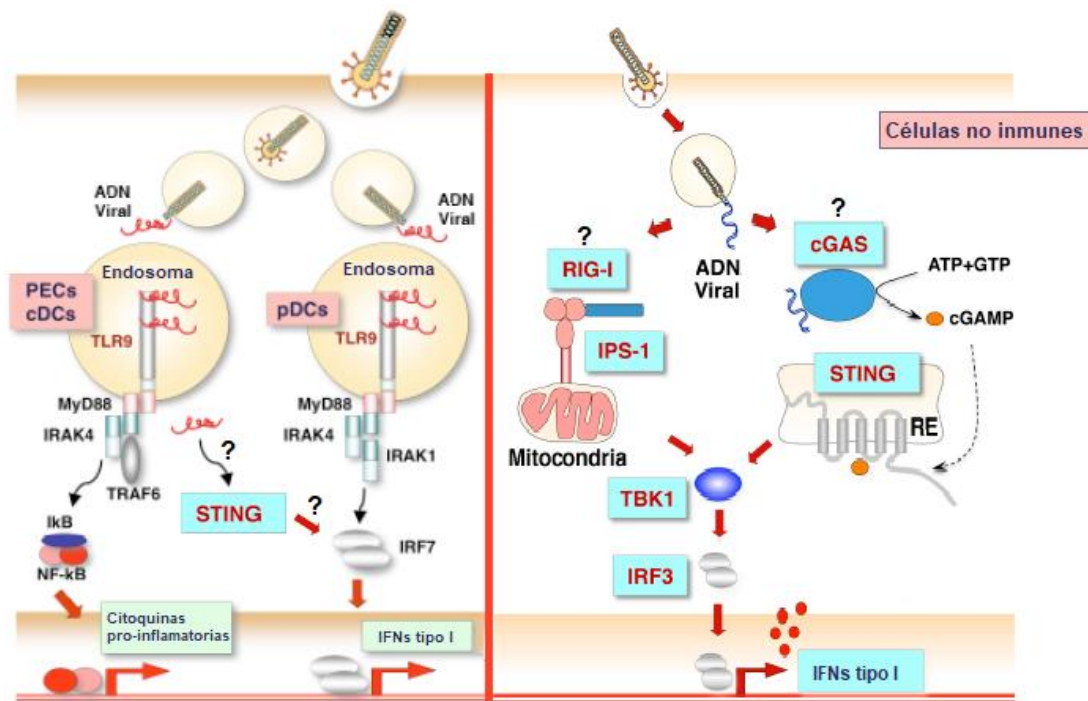


Figura I7. Vías de activación de la respuesta inmune innata por parte de los BVs de AcMNPV. A. Los BVs son internalizados en células inmunes competentes por una vía endocítica y el genoma viral activa el TLR9 produciendo citoquinas pro-inflamatorias por la vía dependiente de NF-κB o IFNs de tipo I en pDCs por la vía dependiente de IRF7. En cDCs y macrófagos peritoneales (PECs, del inglés “peritoneal exudate cells”) la inducción de IFNs de tipo I se da por vías dependientes de STING e IRF7. B. La inducción de IFNs de tipo I en células no inmunes se da por vías dependientes de STING/TBK1/IRF3 o de IPS-1/TBK1/IRF3. *Figura adaptada de “Host Innate Immune Response Induced by Baculovirus in Mammals” [74] (A) y “Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy” [14] (B).*

Las pDCs son las células que producen mayores niveles de IFNs de tipo I al ser estimuladas con BVs, pero Hervas-Stubbs y colaboradores demostraron que los altos niveles de IFN- α e IFN- β producidos en ratones C57BL/6 inmunizados con BVs no dependen de ellas. Tampoco son necesarias para la producción de IFN- γ ni la de IL-12 *in vivo* (Figura I8 A). Contrariamente, las cDCs son indispensables para la producción de IFNs de tipo I y II y de IL-12 en ratones inmunizados con baculovirus (Figura I8 B). Por otra parte, la inducción sistémica de IFNs de tipo I por los BVs no depende de TLR9 o MyD88 (Figura I8 C), pero sí de STING (Figura I8 D). Esto es coherente con el hecho de que las cDCs requieren de STING pero no de TLR9 para la inducción de IFNs de tipo I. Por otro lado, tanto las vías dependientes de TLR9/MyD88 como de STING son fundamentales para la inducción sistémica de IFN- γ e IL-12 por AcMNPV en el modelo murino [71].

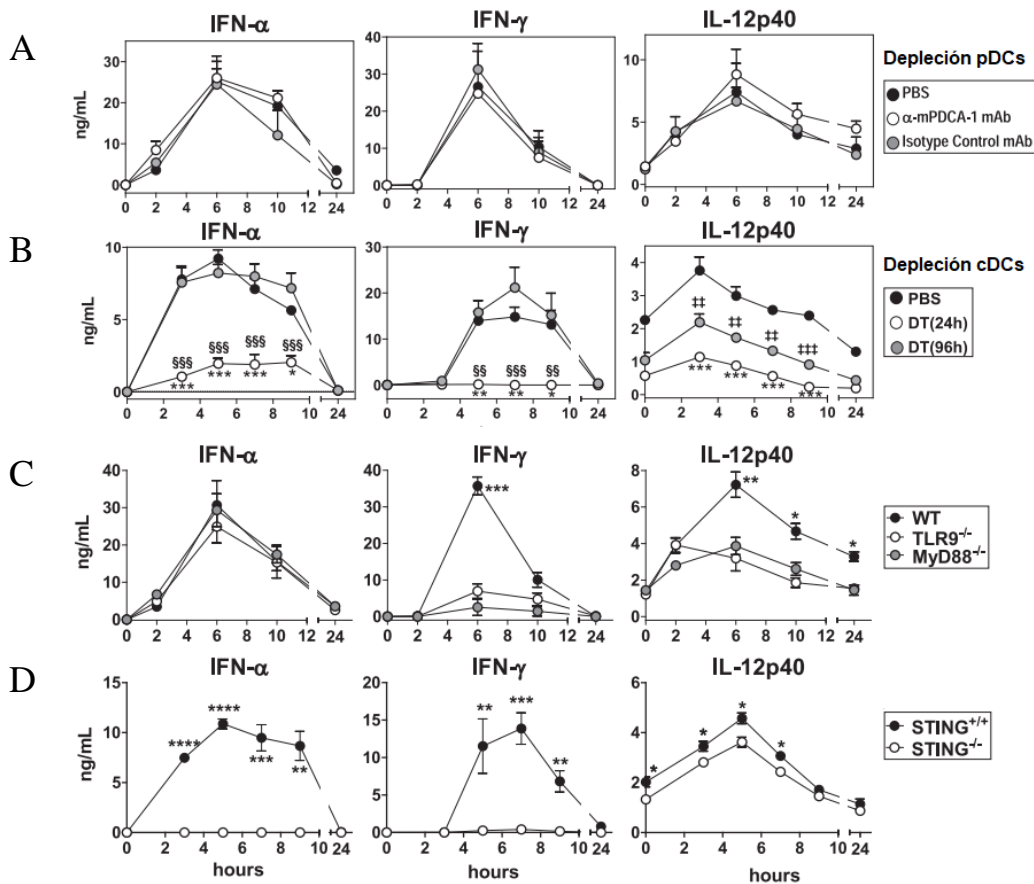


Figura I8. Rol de TLR9, MyD88, STING, cDCs y pDCs en la producción sistémica de citoquinas inducida por baculovirus. Ratones C57BL/6 que recibieron anticuerpo monoclonal anti-mPDCA-1 (Depleción de pDCs) o IgG2b (control isotipo) (A), ratones CD11c-DTR \rightarrow ratón quimérico WT con administración de toxina diftérica por 24 o 96 h (depleción cDCs) o PBS (B), ratones WT (C57BL/6), TLR9^{-/-}

y MyD88^{-/-} (C), o ratones STING^{+/+} y STING^{-/-} (D) recibieron una inyección de BVs de AcMNPV y se les extrajo sangre a distintos tiempos para evaluar citoquinas en suero por ELISA. *p, 0,05, **p, 0,01, ***p, 0,001, ****p, 0,0001. *Figura adaptada de “Conventional but not Plasmacytoid Dendritic Cells Foster the Systemic Virus-Induced Type I IFN Response Needed for Efficient CD8 T Cell Priming” [71].*

Las células NK y NKT son las mayores productoras de IFN- γ durante la respuesta inmune innata inducida por baculovirus [76]. Moriyama y colaboradores demostraron que el BV es capaz de activar directamente las células NK murinas a través de la vía dependiente de TLR9 promoviendo la actividad citotóxica y la producción de IFN- γ . Sin embargo, también observaron que es necesario el contexto de citoquinas para esta activación, por lo que se requiere de efectos del baculovirus tanto directos sobre las células NK como indirectos sobre células productoras de citoquinas pro-inflamatorias [77].

Los BVs activan las DCs estimulando, además de la producción de IFNs y citoquinas pro-inflamatorias, la expresión de las MHC de clase I y II y de las moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 y CD86). El fuerte impacto del BV de AcMNPV en el sistema inmune innato tiene un marcado efecto en el nivel y la calidad de la respuesta inmune adaptativa. Las propiedades adyuvantes de los BVs fueron demostradas por Hervas-Stubbs y colaboradores cuando observaron que la respuesta inmune humoral de ratones contra el antígeno modelo ovalbúmina (OVA) se incrementó alrededor de 1,5 órdenes de magnitud cuando fue coadministrado con BVs. Por otro lado, también observaron que la coinoculación de BVs con esferas de látex recubiertas con OVA otorgaba la capacidad de generar una respuesta celular específica contra OVA [70, 76, 78].

Aplicaciones de los baculovirus en mamíferos

Los BVs han demostrado ser útiles para transducir eficientemente una gran variedad de células de mamíferos, lo que ha llevado a que se los utilice exitosamente en numerosos trabajos como vectores de expresión de genes heterólogos bajo el control de un promotor de mamíferos [79-81]. Tienen numerosas ventajas frente a vectores derivados de virus de mamíferos, incluyendo su incapacidad para replicar en estas células, la ausencia de anticuerpos primarios contra el vector y su baja citotoxicidad. Se reportó que distintas modificaciones en las proteínas de envoltura de los BVs son útiles para aumentar aún más la

eficiencia de transducción de BVs en células de mamíferos. La estrategia más ampliamente utilizada para este fin es el pseudotipado de los BVs con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) [61, 82-88].

Coincidentemente con la potente respuesta inmune innata que promueven, los BVs de baculovirus WT inducen un estado antiviral inespecífico a tiempos cortos que es capaz de proteger ratones contra un desafío con virus influenza [89] o con virus de la encefalomiocarditis [90], así como pollos neonatos contra un desafío con virus de la bronquitis infecciosa [91]. Recientemente también se demostró que su inoculación en ratones logra proteger completamente desde las 6 horas post-inmunización y por al menos 7 días contra un desafío con esporozoítos de *Plasmodium berghei*, agente etiológico de la malaria. Su aplicación también permite eliminar los parásitos presentes en estadio de hígado por mecanismos dependientes del IFN- α inducido por el baculovirus, e independientes de TLR9 [92].

Algunos autores también evaluaron la eficacia del tratamiento con BVs de AcMNPV para desarrollar inmunidad antitumoral en ratones. El baculovirus otorgó protección en el modelo de metástasis de hígado B16, que se perdió al depletar las células NK con anticuerpo monoclonal anti-NK1.1 (PK136), indicando que estas células estarían mediando la respuesta [93]. La inmunización de ratones con DCs tratadas con BVs también logró inducir inmunidad antitumoral contra carcinoma pancreático humano [94] y contra carcinoma de pulmón de Lewis, a través de una respuesta mediada por células NK y por células T CD8⁺, pero no por células T CD4⁺ [95].

Durante los últimos años, el estudio de los efectos adyuvantes producidos por los BVs en el sistema inmune de mamíferos ha llevado a que también se utilicen en el desarrollo de vacunas. El empleo de BVs recombinantes expresando antígenos heterólogos en su superficie (*baculovirus display*) resultó exitoso como mecanismo de inmunización en muchos trabajos, logrando inducir respuestas inmunes celulares y citotóxicas en ratones [89, 96-102]. Por otra parte, estudios realizados por nuestro grupo demostraron que el transporte de un antígeno en la cápside (*capsid display*) de los BVs permite la inducción de una fuerte respuesta citotóxica antígeno específica *in vivo* [76, 100, 103].

La fiebre aftosa

Generalidades de la enfermedad

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral sumamente contagiosa que afecta a animales biungulados tales como bovinos, porcinos, ovinos, caprinos y más de 70 especies salvajes. La FA se caracteriza por fiebre y úlceras en forma de ampollas en la lengua y labios, en la boca, en las ubres y entre las pezuñas. En una población susceptible, la morbilidad es de casi un 100 % y, aunque genera pérdida de peso en los animales por reducción del apetito y caída en la producción de leche, la enfermedad rara vez es fatal en animales adultos (1-5 %). Sin embargo, entre animales jóvenes puede haber mayores tasas de mortalidad (> 20 %) por miocarditis o debido a la falta de amamantamiento cuando la madre está afectada. Aunque la mayoría de los animales se recupera de la enfermedad, las tasas de crecimiento y la producción lechera suelen verse afectadas, sumado al hecho de que estos animales pueden ser portadores del virus e iniciar nuevos focos de la enfermedad [104-107]

El impacto anual de la FA en regiones endémicas suma entre 6,5 y 21 mil millones de dólares en pérdidas de producción y costos de vacunación, mientras que los brotes en países y zonas libres de FA causan pérdidas adicionales de más de 1,5 mil millones de dólares por año [108]. Por estas razones, es referida frecuentemente como la enfermedad veterinaria de mayor importancia económica en países desarrollados y en vías de desarrollo.

El virus de la fiebre aftosa

El agente etiológico de la enfermedad es el virus de la fiebre aftosa (FMDV, del inglés “*Foot and Mouth Disease Virus*”), un virus de cápside icosaédrica desnuda de 25-30 nm, de genoma de ARN simple cadena de polaridad positiva, perteneciente a la familia *Picornaviridae* y al género *Aftovirus*. Tiene un gran marco abierto de lectura que codifica para una única poliproteína que es clivada por proteasas virales para dar origen a las proteínas estructurales y no estructurales. Se distinguen siete serotipos (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asial) que no confieren inmunidad cruzada, por lo que se necesita una vacuna específica para cada uno de ellos. En una infección se produce un gran número de mutantes (las poblaciones de virus tienen la estructura de cuasiespecies), muchas de las cuales son seleccionadas debido

a la presión del sistema inmune. Los errores durante el proceso replicación del ARN viral y la recombinación homóloga entre virus de distintos orígenes son las causas de la generación constante de nuevas variantes de FMDV [105, 109].

La transmisión del virus puede ser por contacto directo con otro animal infectado, por contacto con objetos contaminados, por consumo de productos derivados de carne contaminada, por la ingesta de leche contaminada, por inseminación artificial con semen contaminado o por inhalación de aerosoles. Además, el viento puede transportar el virus a partir de aerosoles por distancias muy largas. Cabe destacar que los grandes animales excretan virus desde 1-2 días antes de la aparición de los signos clínicos y hasta 7-10 días después. El FMDV también puede ser transportado en las vías respiratorias del humano por al menos 24 horas, por lo que la práctica habitual requiere de 3-5 días de cuarentena para el personal expuesto [104, 105, 110].

La fiebre aftosa en cerdos

La mayor parte de investigaciones acerca de la fiebre aftosa se han enfocado en estudiar la patogénesis y la protección otorgada por la vacuna en bovinos y pocos lo han hecho en cerdos. Sin embargo, hay evidencia acumulada de brotes de fiebre aftosa e investigaciones experimentales que sugiere que la patogénesis, inmunología y vacunología de la fiebre aftosa no pueden ser extrapoladas de estudios llevados a cabo en bovinos para explicar o predecir brotes y efectos de las vacunas en cerdos [111].

Los cerdos son más susceptibles a infecciones con FMDV por exposición del tracto gastrointestinal superior (tracto orofaríngeo) que a través de inhalación del virus como en bovinos (tracto nasofaríngeo) [112]. La infección se disemina rápidamente entre cerdos, aunque la eficiencia de transmisión puede variar dependiendo de la cepa viral y la intensidad de exposición. Estudios de patogénesis detallados han demostrado que el epitelio de las amígdalas constituye el sitio de infección primaria luego de la exposición natural al virus. Además, allí se da gran parte de la replicación viral durante la fase clínica aguda de la infección [113]. Los cerdos infectados con FMDV desarrollan fiebre de 40.0°–40.6 °C y anorexia entre 24 y 48 horas luego de la infección epitelial. La infección rápidamente progresa y se vuelve sistémica con sustancial secreción oral y nasal de virus seguido por la

aparición de las típicas lesiones vesiculares. El dolor producido por las vesículas formadas entre las pezuñas les causa cojera, por lo que se resisten a moverse del lugar. Las hembras preñadas pueden sufrir aborto y las crías pueden morir sin desarrollar signos clínicos, generalmente por miocarditis asociada a la infección. La infección se propaga rápidamente entre animales susceptibles en contacto directo o indirecto a través de la generación de aerosoles. Debido a la amplificación masiva y la propagación del virus, los cerdos infectados en fase aguda constituyen una fuente considerable de contagio. Se estima que excretan entre 10 millones y 10 mil millones de dosis por día [105]. La etapa de infección aguda dura entre 1 y 2 semanas y comienza a resolverse gradualmente con el desarrollo de una respuesta inmune robusta. A diferencia de los rumiantes, los cerdos son más eficientes eliminando completamente la infección y no hay un estado de portadores de FMDV subclínico [111].

La infección del FMDV modula componentes de la respuesta inmune del cerdo. Es capaz de inhibir la activación y la capacidad para producir IFNs de tipo I de las DCs, que comienzan a expresar altos niveles de IL-10. Además se induce una severa linfopenia, acompañada de disfunción de las células T [114]. Durante la infección aguda también se reduce la capacidad de las células NK de lisar células diana y de producir IFN- γ [115]. Por lo tanto, el FMDV es muy eficiente inhibiendo y evadiendo el sistema inmune porcino, permitiendo así su replicación y diseminación por el animal. Sin embargo, a los 4-7 días del inicio de la infección se induce una fuerte respuesta inmune humoral que es la que permite superar la enfermedad [116].

Situación de la enfermedad

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) es el organismo internacional encargado de reconocer el estado sanitario de un país o zona con respecto a las enfermedades veterinarias. En particular, para la fiebre aftosa, dicho estatus sanitario puede ser de país o zona libre de FA con vacunación o sin vacunación.

América del Norte y Europa se encuentran libres de FA, pero la enfermedad es endémica en gran parte de Asia y África (Figura I9). En Sudamérica ha habido casos esporádicos. En junio de 2017 se comenzaron a reportar brotes de FMDV del serotipo O en Colombia, aunque no había habido casos detectados en el continente desde que la enfermedad fue reportada en 2013 en Venezuela {(OIE), #1816}

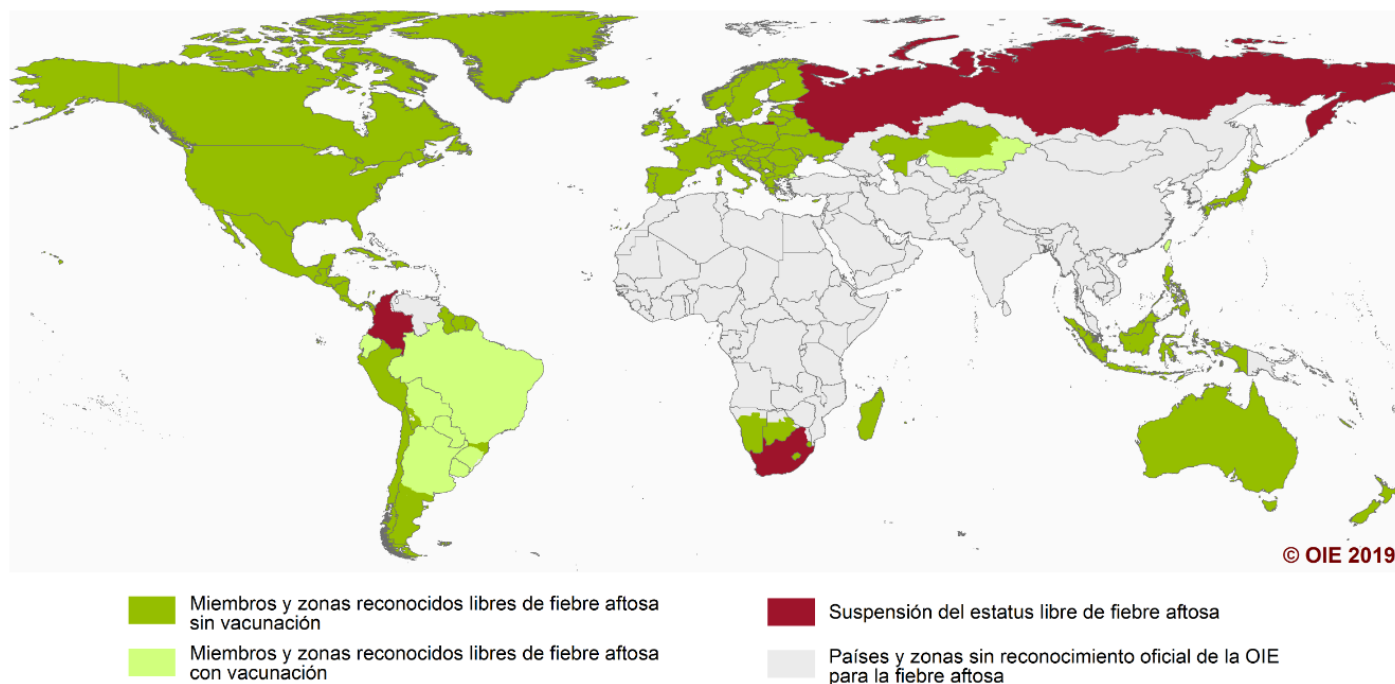


Figura I9. Mapa mundial actual del estatus oficial de fiebre aftosa. La OIE clasifica a los países y zonas reconocidos como libres de fiebre aftosa en dos categorías, según apliquen o no vacunación, de acuerdo con la Resolución No. 22 (86a Sesión General de la Asamblea Mundial, mayo de 2018). *Fuente: OIE.*

La República Argentina desarrolló un Plan Nacional de Erradicación para superar la epidemia que sufrió en los años 2000-2001 y controlar las posteriores reintroducciones. El éxito de las medidas aplicadas ha logrado que la OIE reconociera al territorio nacional como libre de FA, aunque el proceso se llevó a cabo diferenciando 5 zonas:

- **Patagonia: Zona libre sin vacunación.** Aprobada por la OIE en el año 2002 y que fuera ampliada en el año 2007. Zona del Río Negro hacia el sur.

- **Patagonia Norte A: Zona libre sin vacunación.** Estatus otorgado en la 82ª Asamblea General de la OIE, mayo de 2014. Zona comprendida mayoritariamente entre los Ríos Colorado y Negro.
- **Valles de Calingasta: Zona libre sin vacunación.** Pequeña zona de altos valles andinos de pastoreo en la provincia de San Juan, aprobada en la Sesión General de la OIE, en mayo de 2013.
- **Centro Norte: Zona libre con vacunación.** Obtuvo el reconocimiento en el año 2003 y, luego de ser suspendida en dos ocasiones se restituyó finalmente el estatus en el año 2007. Zona desde los ríos Barrancas y Colorado hacia el norte.
- **Cordón Fronterizo: Zona libre con vacunación.** Esta franja de alrededor de 25 km de ancho a lo largo de la frontera quedó excluido de la zona Centro Norte en el año 2007 por tratarse de una Zona de Alta Vigilancia. Se le restituyó la condición de libre de fiebre aftosa con vacunación el 4 de febrero de 2011.

El estatus sanitario de las 5 zonas (Figura I10) debe ratificarse todos los años (Código Terrestre, 2007) en base a resultados de vigilancia epidemiológica.

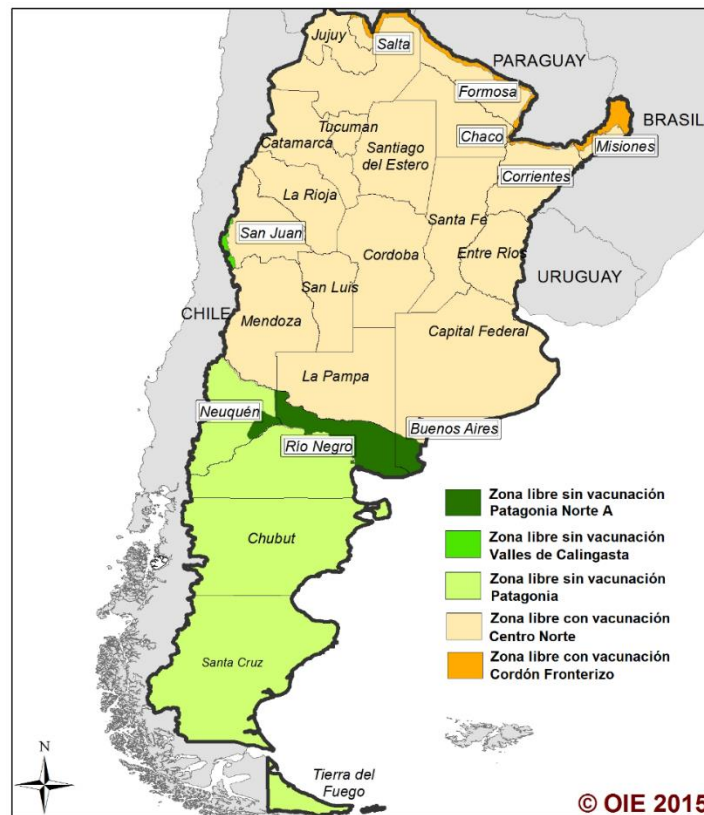


Figura I10. Mapa del estatus sanitario de la FA en Argentina. En el mapa se muestran las tres zonas libres de FA sin vacunación (Patagonia, Patagonia Norte A y los Valles de Calingasta) y las dos zonas libres de FA con vacunación (Centro Norte y el Cordón Fronterizo). Las provincias cuyo nombre está enmarcado son parte de dos zonas libres de fiebre aftosa diferentes. *Fuente: OIE.*

Métodos de prevención y control de fiebre aftosa

Para prevenir la introducción de FA en una zona libre es necesario, como primera línea de defensa, llevar adecuados controles de importación. También es imprescindible brindar entrenamiento en el reconocimiento y diagnóstico de FA, así como contar con laboratorios competentes que realicen pruebas diagnósticas validadas. Debido a la rápida diseminación de la enfermedad, el diagnóstico de FA debe ser veloz y eficaz, seguido por la cuarentena de las granjas afectadas. La estrategia de control más eficiente es el sacrificio de los animales de establecimientos afectados {Association, 2008 #1815}.

Para implementar estrategias de control, en Argentina se diferencian dos grandes zonas en base a las características de suelo, clima, densidad ganadera, dinámica de movimientos y demás propiedades de la estructura productiva:

- Una zona que comprende el norte, centro y este del territorio, de producción bovina de alta concentración y movilidad, que fue zona endémica de la enfermedad.
- Una zona al sur del Río Negro, de muy baja producción bovina, con un relieve de meseta árida de grandes extensiones, con muy baja tasa de contacto, más propicia a la producción ovina para lana y con poca y dispersa población humana, que es considerada un ecosistema naturalmente libre.

La vacunación de todos los bovinos/bubalinos en la zona Centro Norte es de carácter obligatorio. Se utiliza una vacuna oleosa, tetravalente, inactivada con etilenimina binaria (BEI), formulada con adyuvante oleoso y saponina y elaborada por laboratorios privados nacionales; contiene las cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, C3 Indaial. La totalidad de las series de vacunas producidas en el país son controladas por el SENASA, acorde a las recomendaciones del Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres de la OIE (Capítulo 2.1.10). Además, la responsabilidad de la aplicación está delegada a Entes Sanitarios Locales. De todas formas, en el plan se considera la variedad de ecosistemas, las características productivas de cada pequeña región y los circuitos

comerciales, por lo que coexisten distintas modalidades de aplicación de la vacuna mediante las cuales se aplican anualmente cerca de 80 millones de dosis. La República Argentina cuenta con dos laboratorios habilitados para elaborar vacunas antiaftosa con capacidad de producción suficiente para atender la demanda de vacunas de todo el país [117].

Debido a que el plan sólo se aplica en bovinos/bubalinos, los porcinos no reciben vacunación, excepto en situaciones de brote. Además, la mayor parte de los estudios de vacunología son realizados en bovinos y se ha demostrado que la vacunación en cerdos no logra los niveles adecuados de protección contra FA [118, 119]. Por otro lado, la aplicación de la vacuna requiere varios días para inducir una respuesta protectora eficaz, dejando una ventana inmunológica que en bovinos es de aproximadamente 7 días [120]. El desarrollo de vacunas de alta potencia contra FMDV para utilizar en situaciones de emergencia logra protección en cerdos a lo sumo a partir de 4 días-post inmunización. A estos tiempos no se detectan títulos de anticuerpos suficientes, pero se postula que la protección temprana de estas vacunas se da por un aumento en la quimiotaxis de las células de la respuesta inmune innata [121].

Estos factores, sumados a la alta contagiosidad y los tiempos de incubación cortos de la FA en porcinos, hacen crucial el desarrollo de estrategias que puedan inducir rápida protección para frenar la diseminación en situación de brote. Con este fin, se han estudiado nuevas drogas antivirales e inductores de la respuesta inmune capaces de reducir la ventana inmunológica y proteger cerdos contra FMDV a tiempos cortos.

Estrategias Antivirales estudiadas contra FMDV

Existen numerosos trabajos en los que se evalúa la actividad antiviral contra FMDV de compuestos químicos y de extractos de plantas [122-124]. Agentes mutagénicos como el ribavirin también demostraron ser inhibitorios para la replicación de FMDV [125, 126]. Pero la estrategia más exitosa evaluada para inducir protección temprana se basa en el hecho de que la replicación del FMDV en cerdos es altamente sensible a la expresión de IFNs de tipo I, II y III. La inmunización con vectores de replicación defectiva derivados del adenovirus humano serotipo 5 (Ad5) que expresan IFN- α porcino [127], IFN- β porcino [128], IFN- γ porcino [129] o IFN- λ porcino [130] protegió eficazmente cerdos contra desafíos con

distintos serotipos de FMDV a 1 día post inmunización y hasta 3-5 días. Además, está demostrado que la acción de los IFNs de tipo I y II simultáneamente produce un efecto sinérgico en la protección contra FMDV tanto *in vitro*, en cultivos celulares porcinos, como *in vivo*, en cerdos [129]. Los animales tratados con Ad5 que expresan IFNs tienen mayores niveles de expresión de los ISGs y un incremento en el número de células dendríticas en la piel y de células NK en los nódulos linfáticos [131].

Sin embargo, para inducir una respuesta antiviral más potente y prolongada, algunos autores sostienen que los animales deben ser tratados con PAMPs para que interactúen con los PRRs celulares y se induzcan vías naturales de activación [111]. Por esta razón, hay trabajos que evaluaron con éxito en cerdos el uso de ARN doble cadena (poly IC y poly ICLC) [132] y la expresión por Ad5 de la proteína de fusión IRF7/3 para que actúe como factor de transcripción constitutivo [133]. Sin embargo, el empleo de oligodesoxinucleótidos (ODNs) CpG falló en inducir protección en cerdos contra un desafío con FMDV a los 2 días post inmunización, pese a su éxito en ratones [134]. Por otro lado, un trabajo en el que utilizan partículas del virus de la encefalitis equina venezolana conteniendo su genoma de ARN defectivo para inducir protección dio resultados alentadores, aunque por ahora sólo fue evaluado en un modelo murino [135].

En varios trabajos de inmunología antitumoral y antiviral también se ha intentado activar las células NK como estrategia para generar protección. Toka y colaboradores evaluaron la activación de células NK porcinas con una combinación de citoquinas pro-inflamatorias para inducir actividad citotóxica contra células infectadas con FMDV [136].

Por otro lado, los BVs de AcMNPV, que inducen la activación de DCs y de células NK en ratones y, por lo tanto, la producción de IFNs y citoquinas pro-inflamatorias, confieren un estado antiviral inespecífico a tiempos cortos. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que la inoculación de BVs de AcMNPV wt protege ratones C57BL/6 contra un desafío letal con FMDV a 3 horas y 3 días post-inmunización, previniendo el desarrollo de la enfermedad (Figura II1) [137]. Además, la coinoculación en ratones de BVs con la vacuna oleosa a virus inactivado contra FMDV confirió protección más tempranamente que en aquellos que recibieron sólo la vacuna y no se afectó la respuesta humoral inducida [138].

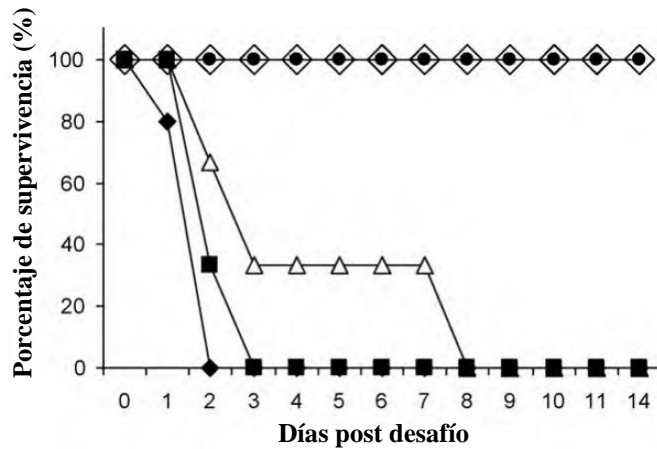


Figura I11. La inmunización con BVs protege ratones contra un desafío letal con FMDV. Curvas de supervivencia de ratones C57BL/6 adultos infectados con $8,5 \times 10^3$ UFPs de FMDV A/Arg/01 que han sido previamente inoculados con BVs de AcMNPV (5×10^7 UFPs) a distintos tiempos previo al desafío. ◆ ratones inoculados con sobrenadante de células Sf9 sin infectar 3 h previo al desafío; ● ratones inoculados con BVs 3 h previo al desafío; ◇ ratones inoculados con BVs 3 d previo al desafío; △ ratones inoculados con BVs 6 d previo al desafío; ■ ratones inoculados con BVs 14 d previo al desafío

Por todas estas razones, el uso de los baculovirus aparece como una estrategia promisoriosa para inducir protección temprana contra FMDV en cerdos. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar, en primer lugar, los mecanismos moleculares, celulares e inmunológicos involucrados en el impacto de los BVs de AcMNPV en el sistema inmune de mamíferos utilizando el modelo murino, para luego evaluar su utilización como inductor de actividad antiviral contra FMDV en cerdos.

Hipótesis

El BV de AcMNPV induce un estado antiviral que permitió conferir protección inespecífica a tiempos cortos frente a un desafío letal con FMDV en el modelo murino.

Dado que el BV estimula la activación de células dendríticas y células NK y, consecuentemente, la producción de interferones tipo I y tipo II, todos ellos factores clave en la respuesta inmune innata contra virus, es posible que estos sean los principales efectores en el estado antiviral conferido por el BV en ratones y que este modelo refleje los efectos inmunoestimuladores que pueda tener en cerdos.

Objetivo

General

Estudiar los mecanismos implicados en la inducción del estado antiviral producido por el impacto de los BVs en ratones, con el fin de optimizar y transferir el uso de esta herramienta biotecnológica para la solución de problemáticas de interés clínico. En particular, en este trabajo se estudiará la posible implementación de esta estrategia para la contención de brotes de fiebre aftosa en cerdos.

Objetivos

Específicos

- Estudiar el rol de la producción de IFNs y de la respuesta mediada por células NK en el estado antiviral conferido por el BV de AcMNPV.
- Estudiar factores del BV que puedan ser determinantes en la interacción con células dendríticas para el desarrollo de la respuesta antiviral.
- Evaluar el impacto de los BVs en la producción de IFNs por células inmunes de origen porcino.
- Explorar el potencial del BV de inducir actividad antiviral contra FMDV en cerdos *in vivo*.
- Generar BVs recombinantes enriquecidos en motivos CpG específicos para cerdos o pseudotipados con proteína G de VSV y evaluar si presentan mejoras en la inducción de actividad antiviral.

Materiales

y

Métodos

Virus

En este trabajo se utilizó el baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyedrovirus* (AcMNPV). También se utilizó el baculovirus Ac-GFP, derivado de AcMNPV pero que porta la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) como fusión a VP39 en cápside, y los baculovirus Ac-pCpG y Ac-GVSV construidos para este tesis como se describe en esta sección.

Para los ensayos de actividad antiviral se utilizó VSV serotipo Indiana, cedido por el Dr. Luis Scolaro, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Para los ensayos de actividad antiviral también se utilizó FMDV del serotipo O1Campos y en los ensayos de desafíos con ratones se utilizó FMDV A/Arg/01, ambos cedidos por la Dra. María Inés Gismondi, Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA-CONICET. La amplificación y titulación del FMDV se llevó a cabo en células BHK-21 (ATCC).

Líneas celulares de lepidóptero

La línea celular de lepidóptero Sf9 (Invitrogen, número de catálogo B82501), que deriva de la línea parental IPLB-Sf-21-AE de *Spodoptera frugiperda*, fue utilizada para la propagación del virus. Estas células se crecieron como monocapa a 27°C en botellas Cellstar de 75 cm² (Greiner Bio-One) utilizando medio Grace's (ThermoFisher), un medio de cultivo optimizado para el crecimiento de estas células, al que se le adicionó 10% de suero fetal bovino (Internegocios-SA) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml, anfotericina B 25 pg/ml, Gibco).

Además, para la titulación de BVs se utilizó la línea celular Sf9-pXXLGFP, construida por nuestro grupo, que expresa GFP bajo el promotor de poliedrina (inducible por infección). La misma se creció bajo la presión de selección del antibiótico blasticidina (Life Technologies), a una concentración final de 10 µg/ml.

Líneas celulares de mamíferos

La línea celular Vero (ATCC) derivada de riñón de mono verde africano fue utilizada para la propagación de VSV, y la titulación de VSV infeccioso fue realizada en células MDBK (ATCC) derivadas de riñón bovino. Para los ensayos de actividad antiviral contra VSV se utilizaron las células derivadas de riñón porcino IBRS-2 [139], provistas por ICT Milstein, y células MDBK. Los ensayos de actividad antiviral empleando FMDV se realizaron en la línea celular porcina LFBK [140, 141], derivada de tejido de riñón porcino, que fue cedida por el laboratorio del Dr. Mariano Pérez Filgueira, Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET.

En todos los casos las células se crecieron en monocapa en estufa a 37 °C con 5% de CO₂. Se utilizó medio MEMD o MEME/MEMD en partes iguales suplementado con 10% SFB (Internegocios-SA) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomycinina 10 mg/ml, anfotericina B 25 pg/ml, Gibco).

Ratones

Se utilizaron ratones hembra libres de patógenos especificados (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*), de la cepa C57BL/6 para todos los experimentos realizados. Los ratones se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (progenitores procedentes del Jackson Laboratory, USA). Los ratones IFNAR1^{-/-} SPF utilizados, de genética B6(Cg)-*Ifnar1*^{tm1.2Ees}/J y obtenidos a partir de la cepa C57BL/6, provinieron del bioterio dependiente del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología y de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (progenitores procedentes del Jackson Laboratory, USA).

La edad de los ratones al momento de los experimentos que incluyeron inmunización con baculovirus y/o desafío con FMDV fue de entre 8 y 9. Para la extracción de médula ósea se utilizaron ratones de 6 semanas de edad. Los experimentos con ratones se realizaron en el bioterio del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA-CONICET, y en el bioterio del Laboratorio de Contención Biológica NSB-4 OIE perteneciente al Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET.

Cerdos

Cerdos (*Sus scrofa domestica*) de 9 semanas de edad, producto de la cruce entre las razas Hampshire y Yorkshire, fueron utilizados para los experimentos realizados, así como para extraer sangre para la obtención de CMSPs. El trabajo con porcinos se realizó en el Centro de Reproducción y Biotecnología Animal, dependiente del INTA-Castelar y la Universidad Maimónides.

Cepas bacterianas

Para las estrategias de clonado molecular se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaI^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ lacZ)M15.

Para la generación de b λ cmidos recombinantes se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH10B, cuyo genotipo es: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsd RMS-mcr BC) ϕ 80 d lac ZDM15 Δ lacx74 deo R recA1 end A1 araD139 Δ (ara, leu) 7697 gal U gal K λ ⁻¹ rps LnupG.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio LB (triptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7 con NaOH). En el caso de requerirse un medio semisólido, se le agregó agar a una concentración final de 1,5 g/100 ml. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos o erlenmeyers con un volumen no mayor al 10 % de su capacidad total, con agitación constante de 200 rpm a 37 °C.

Las cepas bacterianas transformadas con un vector plasmídico se crecieron con medio de cultivo en presencia del antibiótico de selección adecuado.

Metodología del ADN recombinante

Minipreparaciones de ADN

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979) con ligeras modificaciones. Se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con ampicilina, crecido toda la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 x g en una microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en 200 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Luego, se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %), se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 200 µl de Solución III (acetato de potasio 3 M) y se mezcló por inversión. El floculado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. Se enjuagó el precipitado con etanol 70 %, se secó bajo vacío y se resuspendió en 50 µl de agua con ARNasa (100 µg/ml).

Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Se utilizaron las columnas de intercambio aniónico comerciales “Qiaprep spin miniprep kit” (QIAGEN). La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir de 3 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas, de los cuales se obtuvieron aproximadamente 20 µg de ADN que fueron eluidos de la columna con 100 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.

Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron 500 ng de ADN, 5 unidades de enzima de restricción (New England Biolabs), buffer apropiado y un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron 2 h a la temperatura recomendada para cada enzima.

Defosforilación de los extremos 5' fosfato

La remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando 5 unidades de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs), agregadas directamente al volumen de la digestión. La reacción se incubó por 15 min a 37 °C.

Electroforesis en geles de agarosa

Se emplearon geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 y 1,5 %. Los geles se corrieron en buffer TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Con el fin de visualizar las bandas de ADN, se utilizó el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml de gel. Para sembrar las muestras, se utilizó un buffer de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 10X, azul de bromofenol 1 %). Los geles se fotografiaron utilizando un equipo Fotodyne y el programa Collage (Macintosh).

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Las bandas de ADN resueltas mediante geles de agarosa se escindieron del gel mediante el uso de bisturí y se purificaron utilizando el kit "QIAEX II Gel Extraction Kit" (QIAGEN). El ADN obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector y diferentes relaciones molares vector:inserto (1:1 y 1:3). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, en presencia de buffer de ligado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditiotretitol 10 mM, dATP 1 mM, seroalbúmina

bovina 25 µg/ml) y 10 unidades de la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs). La reacción se incubó a 16 °C toda la noche, incluyendo un control de vector sin inserto.

Transformación de bacterias

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (1985) y se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta su uso. Entonces, se descongelaron en hielo y a 50 µl de bacterias se les agregaron 5 µl del producto de ligado, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 min. A continuación, se realizó un choque térmico a 42 °C por 90 s y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregaron 200 µl de medio LB, se incubó a 37 °C con agitación suave y se plaqueó en medio LB agarizado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche, las colonias se picaron y se usaron para inocular cultivos de 3 ml de LB con ampicilina.

Secuenciación de ADN

La secuenciación automática de ADN se realizó en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación Automática del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular del INTA Castelar, mediante la utilización del equipo Genetic Analyzer 3130x1 (Applied Biosystems).

Construcción de BVs recombinantes

Síntesis de una construcción enriquecida en motivos CpG específicos para cerdos

La construcción pCpG que incluye las secuencias de los ODNs 2216 [142, 143], D19 [142, 144], H1a [143] y ODN 3 [145] combinadas y en seis repeticiones en tándem fue sintetizada químicamente por la empresa GenScript. La secuencia fue sintetizada con ambos

extremos flanqueados por el sitio de restricción para EcoRI (ver Figura A1 en sección Anexo) e incluida en un plásmido pUC57.

Construcción de los vectores de transferencia pFBGVSV y pFBpCpG

Para la construcción de los BVs recombinantes se empleó el sistema “Bac to Bac” (Invitrogen). Con este fin, se clonó el gen G-VSV o la construcción pCpG en el plásmido de transferencia comercial pFastBac 1 (Invitrogen), digiriendo con EcoRI este plásmido y los plásmidos dadores pUC57-pCpG y p-CMV-VSV-G. La ligación de vector e inserto se realizó por 12 h a 16°C, y se utilizaron 5 µl de esta reacción para transformar bacterias *E. coli* DH5α. Las bacterias transformadas se seleccionaron con ampicilina. La presencia y orientación de G-VSV y pCpG en estos vectores se analizó en varios clones por digestión con enzimas de restricción y por secuenciación. EcoRI fue utilizada para determinar la inserción de GVSV y NcoI para su orientación, mientras que NotI y BamHI se empleó para determinar la inserción de pCpG. De esta manera, se obtuvieron los vectores pFB-GVSV y pFB-pCpG.

Obtención de los báculos recombinantes

50 µl de *E. coli* DH10B competentes fueron transformadas con los plásmidos de transferencia obtenidos. Las bacterias que incorporaron el plásmido se seleccionaron en placas de LB agar con kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml y gentamicina 7 µg/ml; el evento de transposición fue seleccionado por el color de la colonia (fenotipo blanco) en presencia de IPTG 40 µg/ml y Bluo-gal 100 µg/ml. La purificación del báculo se realizó según se describe en el manual expresión en baculovirus [146]. A continuación, se confirmó la presencia del cassette de interés en el báculo recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13 for y M13 rev que flanquean el sitio de transposición. Para esta reacción se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y el ciclo de amplificación fue 95 °C 5 min, (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 5 min) x 30 ciclos, 72 °C 7 min.

Obtención de los BV recombinantes

Se utilizó el método de transfección con lípidos catiónicos para obtener BVs recombinantes en células Sf9. Se mezclaron, en un tubo de 1,5 ml, 100 μ l de medio Grace's con 2,5 μ g de ADN del bácmido recombinante y 100 μ l de medio Grace's con 10 μ l de cellfectina (Invitrogen). La mezcla se incubó 15-45 min a temperatura ambiente, se agregaron 0,8 ml de medio Sf 900 y se volcó sobre una monocapa de células Sf9 crecida en placas de seis pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Las placas se incubaron por 4 h a 27 °C, luego se removió el medio de transfección y se agregaron 3 ml de medio Grace's suplementado con 3 % de SFB. Tras 6 días de incubación a 27 °C, se colectaron los sobrenadantes en forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1.000 x g durante 10 min y se conservaron refrigerados. Se le realizaron dos pasajes en células Sf9 a los BV recombinantes para alcanzar títulos de al menos 1×10^8 UFP/ml.

Preparación de *stocks* virales

Stock de BVs de AcMNPV

$2,5 \times 10^7$ células Sf9 fueron sembradas por botella Cellstar de 175 cm² (Greiner Bio-One) con medio Grace's 10% SFB (Internegocios). Luego de reposar las botellas horizontalmente durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se adhieran las células a la superficie, se les quitó el medio de cultivo y se agregó una solución de 6 ml de medio Grace's sin SFB, conteniendo $2,5 \times 10^6$ BVs AcMNPV wt, Ac-GFP, Ac-pCpG o Ac-GVSV por botella (moi = 0,1). Se incubó la infección durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando la botella cada 10 minutos para asegurar la distribución equitativa de virus en toda la monocapa celular. Una vez finalizada la incubación se retiró el inóculo viral y se volvió a agregar medio de cultivo Grace's 10% SFB, para luego devolver las botellas a la cámara de 27°C. El día 4 post-infección se retiró el medio de cultivo de las botellas y se clarificó por centrifugación a 1.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se trasvasó a un tubo cónico de 50 ml y se guardó a 4°C y en oscuridad hasta su uso.

Stock de poliedros de AcMNPV

Se realizó el mismo protocolo utilizado para amplificar los BVs, pero en este caso, el día 7 post-infección se levantaron las células dando golpes ligeros contra el borde de la botella y resuspendiendo numerosas veces el medio con pipeta de 10 ml. Se colocó el sobrenadante conteniendo las células en suspensión en tubos cónicos de 50 ml y se contó el número total de células en cámara de Neubauer. Se centrifugaron en centrífuga SIGMA 4k15 a 7.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado con PBS. Se descartó el sobrenadante para resuspender las células en SDS 0,5% (10 ml de SDS cada 2×10^8 células), momento en el cual la solución se vuelve viscosa, por lo que se pasó repetidamente por una jeringa con aguja 25GX5/8 transvasándose a tubos córex de vidrio para evitar el pegado de los poliedros a las paredes de plástico, lo que bajaría el rendimiento de la purificación. A continuación se centrifugó a 7.000 x g durante 10 minutos en centrífuga Sorvall y se resuspendió el pellet en el mismo volumen pero de NaCl 0,5 M. Se centrifugó nuevamente a 7.000 x g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en el mismo volumen pero de agua apirógena. Finalmente, se centrifugó una vez más a 7.000 x g por 10 minutos y se resuspendió el pellet en agua apirógena. En este paso se obtuvo un *stock* de poliedros que se conservó a -80°C . Se utilizaron materiales libres de LPS durante todo el proceso de purificación.

Stock de ODVs de AcMNPV

Parte del *stock* de poliedros se utilizó como punto de partida para purificar ODVs antes de la realización de cada experimento, para lo cual se le agregó una décima parte de solución alcalina de carbonato de sodio 1 M (resultando 0,1 M de concentración final) con el fin de disolver la proteína poliedrina. Se incubó durante 30 minutos, al término de los cuales se neutralizó la solución agregando Tris HCl 1 M pH 7,6 hasta 0,1 M.

Se centrifugó por 10 minutos a 7.000 x g en centrífuga Eppendorf Para lograr el precipitado de los poliedros sin disolver. Los ODVs obtenidos en cada disolución de poliedros fueron utilizados en el día. En todo el proceso se utilizaron materiales libres de LPS.

Stock de VSV

Botellas T75 (CELLSTAR) fueron sembradas con 1×10^7 células Vero en 12 ml de medio MEMD adicionado con 10% SFB (Internegocios). Se infectaron las células con $MOI = 0,1$ de VSV por agregado del virus a la botella e incubación en estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con 5 % de CO_2 . Cuando se observó efecto citopático (48 hs aproximadamente) se cosechó el sobrenadante y se clarificó a $450 \times g$ por 10 min. Se guardó en alícuotas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Cuantificación de los *stocks virales*

Titulación de virus infectivo por dilución a punto final

La titulación de virus infectivo se realizó siguiendo el protocolo propuesto por O'Reilly (O'Reilly et al. 1994), utilizando para BVs de AcMNPV la línea celular Sf9-pXXLGFP que fluoresce sólo en presencia de replicación viral y para VSV la línea celular MDBK.

Para la titulación de BVs se realizaron diluciones seriadas al décimo de los *stocks* virales (de 10^{-4} a 10^{-8}), y se agregó 100 ul de cada una a 900 ul de células Sf9-pXXLGFP a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml para la pre-adsorción del virus a las células. Luego, de cada suspensión se agregaron 100 ul en 8 pocillos (una columna) de una placa de 96 pocillos, mientras que en una columna adicional se colocaron células sin infectar (control negativo). La placa se incubó por 7 días en cámara húmeda a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se contaron pocillos infectados (fluorescentes) por visualización al microscopio en presencia de luz UV.

Para la titulación de VSV, se utilizó una placa de 96 pocillos en la que se sembraron 50 ul conteniendo 3×10^4 células Vero por pocillo. Por otro lado, se realizaron diluciones seriadas al décimo del stock de VSV y se agregaron 50 ul por pocillo, ocupando cada columna de 8 pocillos con una dilución distinta. Adicionalmente, en una columna se agregó medio de cultivo Grace's sólo como control de células sin infectar. Después de 7 días fijamos las células con formol y revelamos con cristal violeta para contar pocillos infectados y no infectados.

Los títulos virales se calcularon según el método descrito por Reed y Muench [147].

Cuantificación relativa de ODVs

Para administrar igual cantidad de nucleocápsides de BVs y ODVs, cuantificamos los dos fenotipos virales por cantidad relativa de VP39. La cuantificación se realizó por comparación de la masa de la proteína de cápside VP39 midiendo la intensidad de banda obtenida en un ensayo de Western blot revelado con anticuerpo monoclonal contra VP39. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con el software Image Quant TL 1D (GE, Healthcare).

Concentración de Ac-GVSV por ultracentrifugación

Los BVs de Ac-GVSV se concentraron por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 25 % m/v, en PBS pH 7 a 57.000 x g por 60 min a 8 °C. Los pellets se resuspendieron en PBS pH 7 y se les agregó buffer de siembra para analizar por electroforesis de poliacrilamida.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para analizar la presencia de las proteínas VP39, GP64, P74 o GVSV, los baculovirus fueron concentrados por centrifugación a 21.000 xg por 1:15 h, resuspendidos en buffer de siembra (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% 2-mercaptoetanol, 1% SDS, 0.002% azul de bromofenol y 10% glicerol, 1X) y colocados en un baño a 100°C por 10 min. Las muestras (15 ul) fueron resueltas en electroforesis en gel de poliacrilamida de concentración 12 % en condiciones desnaturizantes, concentración elegida en base al peso molecular de las proteínas virales. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. Se utilizaron minigeles de 6 x 9 cm (Miniprotein III, Biorad), que se corrieron a un voltaje

constante de 80 V por 15 min y luego de 100 V en buffer Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

Identificación de proteínas mediante Western Blot

Electrotransferencia

Luego de la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron con buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 190 mM; metanol 20 %). Se cortó un rectángulo de nitrocelulosa (S&S BA 0,45 µm, Schleicher & Schuell) de tamaño algo mayor que el del gel y se dispuso sobre la cara del cassette de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja del tipo Scotch Brite (Bio-Rad), un papel de filtro Whatmann 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatmann 3 mm y una esponja del tipo Scotch Brite. Se montó el cassette dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), llena con buffer de transferencia, y se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA a 4 °C por 1,5 h.

Detección inmunológica de proteínas

Se bloquearon los filtros por 1 hora a temperatura ambiente en buffer TBS-Tween-leche 5% (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %, leche descremada 5%). Luego, se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos (ratón anti-P74, N25 8c, provisto generosamente por P. Faulkner 1:1.000; ratón anti-VP39 provisto generosamente por MA Whitt, 1:2.000, [15]; ratón anti-GP64, AcV5, Sigma, 1:2.000, [148]; ratón anti-GVSV, SIGMA, 1:1000) en TBS-Tween-leche 3%. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 5 min y se incubaron con el segundo anticuerpo en TBS-Tween-leche 3% (cabra anti-ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina 1:5.000, SIGMA), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los filtros se lavaron 3 veces con solución de lavado y una vez en buffer de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM;

MgCl₂ 5 mM) por 5 min, y se agregaron 5 ml de solución de revelado [10 ml de buffer de revelado, 66 µl de Nitro blue tetrazolium (NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %, Promega) y 33 µl de bromocloro-indoil-fosfato (BCIP, 50 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Promega)]. Se incubó con agitación suave por 3 a 20 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se resguardaron de la luz.

Microscopía electrónica

Se colocaron grillas de cobre de 200 mesh cubiertas con formvar sobre una gota (10 µl) de ODVs concentrados, dispuestos sobre una pieza de parafilm en una caja de Petri, por 5 min. Luego, se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2 % por 30 s. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico Zeiss±EM109T de Facultad de Medicina, UBA a un aumento de 85.000 x. A partir de 15 partículas se calculó la media y el error estándar de longitud y grosor mediante el software ImageJ.

Experimentos con DCs derivadas de médula ósea (BMDCs)

Producción de las BMDCs

Se obtuvieron células de médula ósea de fémur de ratones de 6 semanas de edad y se las cultivó en placas de Petri bacteriológicas durante 8-9 días a 37 °C, CO₂ 5%. Como medio de cultivo se utilizó RPMI (Gibco) suplementado con SFB 10 % (Natocor), 2-µ-mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M, glutamina 5x10⁻⁵ M (GlutaMAX, Gibco), penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 ug/ml) (Gibco) y 10% de sobrenadante de células J588 secretoras de GM-CSF. A los 3 y 7 días se agregó medio de cultivo nuevo con GM-CSF. Para utilizar las células, se levantaron al 8°-9° día de diferenciación pipeteando repetidamente, se centrifugaron 5 min a 800 x g y se resuspendieron en RPMI suplementado de la misma manera.

Acidificación de BVs

La acidificación de BVs a pH 4,5 se realizó por agregado de 220 μ l de PBS pH 1,7 a 200 μ l de BVs en medio Grace's (pH 6,2) o a 200 μ l de mock de infección para utilizar como control. Luego de incubar por 30 min a temperatura ambiente se les agregó 140 μ l de PBS pH 12,5 para llevar el pH nuevamente a 6,2.

Neutralización de BVs

Se incubaron BVs de AcMNPV con una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti-GP64 neutralizante (AcV1) o no neutralizante (AcV5) como control, por 30 min a 37°C.

Estudio de captura en BMDCs

Las BMDCs fueron sembradas en placas de 96 pocillos fondo en U (1×10^7 células por pocillo) y tratadas con manano durante 30 min a 37 °C. Luego, se agregaron 1×10^9 o 5×10^9 BVs de Ac-GFP por 1 h a 37 °C. Luego, se levantaron las células por pipeteo, se pasaron a placa de 96 pocillos fondo en V, se centrifugaron 5 min a 800 x g y se lavaron con *buffer staining*. Se marcaron con anticuerpos anti-CD11c (clon HL-3) y se las analizó por citometría de flujo.

Estudio de la maduración de BMDCs

Las BMDCs en placas de Petri fueron tratadas con BVs ($moi = 50$), BVs acidificados o incubados con anticuerpos monoclonales (mismo volumen que BVs sin tratar), mock de infección (sobrenadante de células Sf9 sin infectar, volumen equivalente al tratamiento con BVs) o mock acidificado o incubados con anticuerpos. Luego de 18 h, se levantaron las células por pipeteo, se centrifugaron 5 min a 800 x g y se lavaron con *buffer staining*, mientras que los sobrenadantes se guardaron a -80°C para evaluar actividad antiviral. Finalmente, las BMDC se marcaron con anticuerpos anti-CD11c (clon HL-3), anti-MHC II (clon M5/114.15.2) y anti-CD86 (clon GL1) y se las analizó por citometría de flujo.

Tratamiento de BMDCs con baculovirus para inmunofluorescencia

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ BMDCs por cubreobjeto previamente tratado con una solución de poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich). Se incubaron durante 30 minutos para que se adhiran a la superficie y, luego, se llevaron a 4°C por 15 minutos. A continuación se agregaron los BVs ($1,25 \times 10^7$ UFPs), ODVs (masa equivalente a 1×10^8 UFP de BVs), 10 µg/ml OVA-FITC, 10 µg/ml de DQ-OVA (Invitrogen) y/o 1×10^2 nM de LysoTracker DND-99 (Invitrogen), incubando por 10 minutos a 4°C (sincronización). Luego se llevaron a 37°C por 20 minutos (penetración) y, luego de lavar con medio completo, se incubaron por el tiempo especificado para cada experimento.

Inmunofluorescencia de BMDCs

Las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron incubándolas por 10 minutos a 4°C con paraformaldehído 2% en PBS. Luego de dos lavados con PBS se guardaron las células a 4°C hasta el otro día.

Se lavaron 3 veces con glicina (Quenching) y se lavó una vez con PBS. La permeabilización se realizó incubándolas 20 min a temperatura ambiente con PBS-BSA-saponina (PBS con 0,2% BSA y 0,05% saponina). Al término de esta incubación se agregaron los anticuerpos primarios en PBS-BSA-saponina (anticuerpo monoclonal de ratón anti-VP39, (provisto generosamente por MA Whitt, [15], 1:100). Se incubaron durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-BSA-saponina y se agregó el anticuerpo secundario (anti-ratón ALEXA 488, Invitrogen, 1:800) y el anticuerpo anti-LAMP2 (conjugado con alexa 647, 1:400) diluido en PBS-BSA-SAPONINA y se incubaron durante 1 h a 4°C. Se lavaron 3 veces con PBS-BSA-saponina, 2 veces con PBS, y se montaron los vidrios utilizando líquido de montaje (mowiol).

Microscopía confocal

Las células se observaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems GmbH). Se tomaron fotos de las células con los distintos tratamientos utilizando un objetivo de aceite 40X (HCX PL APO CS 40.061.25 OIL UV).

Experimentos con células mononucleares de sangre periférica de cerdos (CMSPs)

Purificación de las CMSPs

Se colocaron aproximadamente 12 ml de sangre extraída de cada cerdo en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron por 15 min a 2400 rpm. Se tomó la interfase obtenida y se diluyó en 7 ml de medio DMEM (Gibco), para ser colocada lentamente y en 45° de inclinación en otro tubo cónico conteniendo 2,5 ml de Ficoll. Luego de una centrifugación a 2000 rpm por 25 min se tomó la capa de células mononucleares, que corresponde a la capa presente inmediatamente sobre el ficoll, y se le realizó dos lavados con DMEM centrifugando 12 min a 900 rpm. Finalmente, el pellet se resuspendió en 2 ml para contabilizar células en cámara de Neubauer. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) se mantuvieron DMEM (Gibco) suplementado con SFB 10 % (Natocor), 2- μ -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, glutamina 5×10^{-5} M (GlutaMAX, Gibco) y penicilina/ estreptomina (100 U/ml y 100 μ g/ml) (Gibco), a 4°C hasta su uso dentro de las 18 h.

Tratamiento de las CMSPs con BVs

Para estudiar la producción de mediadores antivirales en sobrenadante se sembraron 5×10^6 CMSPs en pocillos de placas de 12 pocillos (Greiner Bio-One) en un volumen de 700 μ l de medio DMEM suplementado. Se agregaron BVs de AcMNPV, Ac-pCpG o Ac-GVSV a distintas moi o mock de infección y se incubaron a 39°C por 1 h. Luego, se llevaron los pocillos a un volumen final de 2 ml y se incubaron por 16 h. Se cosecharon los sobrenadantes

y se clarificaron a 425 x g. Los sobrenadantes fueron guardados en alícuotas a -80°C hasta la determinación de actividad antiviral e IFN- α .

Para estudiar las células productoras de IFNs, $3,5 \times 10^7$ CMSPs fueron sembradas en placas de Petri de 60 mm de diámetro en 7 ml de medio DMEM suplementado y tratadas con BV de AcMNPV (moi = 10) o mock de infección. 1,5 h después se les adicionó monensina (Sigma) y se incubaron por 4,5 h adicionales. Se cosecharon las células por pipeteo y se procedió a la marcación y determinación de las células productoras de IFN- α e IFN- γ .

Determinación de células productoras de IFNs

Las células se centrifugaron a 150 x g durante 10 min a 4 °C, las células se resuspendieron en *buffer staining* (BS: PBS, SFB 5 % y azida sódica 0,1 %) a una concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml y se colocaron 100 μ l de cada una en una placa de 96 pocillos fondo en V. Se realizaron dos lavados en BS y se resuspendieron en 50 μ l de BS con la dilución de anticuerpos dirigidos a moléculas ubicadas en la superficie celular (anti-CD3 clon ppt3 conjugado a PerCP-Cy5.5 ; anti-CD172a/SWC3 clon 74-22-15 conjugado a PE). Luego de incubar 40 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron las células dos veces con BS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 % durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 μ l de BS y se conservaron a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 200 μ l de *buffer* de permeabilización (BP: BS y saponina 0,3 %). Luego de realizar dos lavados con BP, se resuspendieron en 50 μ l de la dilución de anticuerpo anti-IFN- α (clon F17, conjugado a Alexa Fluor 647) o anti-IFN- γ (clon CC302, conjugado a PE) en BP y se incubó 40 min a 4 °C en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células dos veces en BP y una vez en BS, y se fijaron nuevamente en PFA 1 % durante 30 min a 4 °C. Se realizaron dos lavados en BS y se resuspendieron las células en 500 μ l de buffer FACs para analizar por citometría de flujo adquiriendo 1.000.000 de eventos.

Citometría de flujo

Se utilizó el citómetro de flujo digital FAC Calibur y el programa CellQuest software (BD Immunocytometry Systems). Las muestras se resuspendieron en 500 μ l de *buffer* FACS

(BD Argentina S.R.L.) y se analizaron a un flujo de 200-600 eventos por segundo. En primer lugar, se realizó el ajuste de voltaje del citómetro con células no marcadas. Luego, se realizó la compensación de los canales utilizando células marcadas con un solo fluorocromo. Para todas las condiciones ensayadas se incluyó el control de células no marcadas (control de autofluorescencia). El análisis de los resultados se realizó con los programas CellQuest o Flow Jo (versión 10.0.7 Free Star Inc, EEUU).

Ensayos para evaluar citoquinas

ELISA de IFN- γ e IL-6 murino

La cuantificación de IFN- γ e IL-6 se realizó por ELISA *sándwich* mediante los kits comercial *Mouse IFN- γ ELISA Set* y *Mouse IL-6 ELISA Set* (BD OptEIA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se cubrieron placas de 96 pocillos (H2B Maxisorp, NUNC) con 100 μ l por pocillo de la dilución del anticuerpo de captura en *buffer* carbonato (carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,5) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas cinco veces con 100 μ l de PBS-Tween (Tween 20 0,05 %) y se bloquearon durante 1 h con 200 μ l de PBS-SFB 10 % a 37 °C. Luego de realizar cinco lavados, se colocaron las diluciones de las muestras y los puntos de la curva estándar realizados en PBS-SFB 10 % y se incubaron las placas a 37 °C por 2 h (todas las determinaciones se realizaron por duplicado). Luego de 5 lavados se agregaron 100 μ l de la mezcla de detección por pocillo por 1 h a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas siete veces, se agregaron 100 μ l de solución de sustrato comercial *TMB Substrate Reagent Set* (BD Pharmingen) y se incubaron 30 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 μ l de H₂SO₄ 2 N y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (Multiskan, Labsystems).

ELISA de IFN- α porcino

La cuantificación de IFN- α porcino se realizó por un ELISA casero. Se cubrieron placas de 96 pocillos (H2B Maxisorp, NUNC) con 100 μ l por pocillo de una dilución (1:4000) del anticuerpo monoclonal ratón anti-pIFN- α (clon K9) en *buffer* carbonato

(carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,5) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se lavaron las placas cinco veces con 100 µl de PBS-Tween (Tween 20 0,05 %) (PBS-T) y se bloquearon durante 1 h con 200 µl de PBS-T con 5 % leche y 2 % suero normal equino (SNE) a 37 °C. Luego de realizar cinco lavados, se colocaron las diluciones de las muestras y los puntos de la curva estándar realizados en PBS-T con 5 % leche y 2 % SNE y se incubaron las placas a 37 °C por 2 h (todas las determinaciones se realizaron por duplicado). Luego de 5 lavados se agregaron 100 µl de una dilución (1:5000) de anticuerpo policlonal conejo anti- pIFN- α por 1 h a 37 °C y, luego de 5 lavados más, con anticuerpo anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa (HRP) en una dilución 1:2500 por 1 h adicional a 37 °C. Finalmente, se lavaron las placas siete veces, se agregaron 100 µl de solución de sustrato comercial *TMB Substrate Reagent Set* (BD Pharmingen) y se incubaron 30 min a 37 °C en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 N y se leyó la densidad óptica a 450 nm en un lector de ELISA (Multiskan, Labsystems).

Bioensayos de actividad antiviral

Células IBRS-2, MDBK o LFBK, fueron tratadas con diluciones seriales de muestras de suero o sobrenadante de cultivo celular, comenzando en 1/4, en una placa de 96 pocillos. Después de 16 h, se descartaron los sobrenadantes y las células fueron infectadas con VSV serotipo Indiana (IBRS-2 y MDBK) o con FMDV serotipo O1Campos (LFBK). Los pocillos infectados fueron evidenciados a las 24 h (MDBK o LFBK) o a las 72 hs (IBRS-2) por tinción con cristal violeta. El colorante fue resuspendido en una solución de etanol 50% y acetato 0,1% y la densidad óptica medida a 595 nm.

Para la titulación de actividad antiviral, a cada valor de densidad óptica obtenido se le restó la absorbancia blanco, perteneciente a pocillos control (C-) en los que se levantó completamente la monocapa por infección viral sin pretratamiento. Por otro lado, en todos los ensayos hubo pocillos control (C+) sin infectar, y la mitad de su densidad óptica fue tomada como punto de corte para evaluar si un pocillo estaba protegido o no. Este punto de corte está descrito que es el más recomendable para aumentar la sensibilidad de la técnica. En base al número de pocillos protegidos se calculó la concentración de muestra que resulta en una reducción del 50% en el número de pocillos infectados, es decir la concentración de

inhibición media para la infección (IC_{50}). En el caso de muestras murinas la actividad antiviral se expresó como la inversa de la dilución correspondiente al IC_{50} . En el caso de muestras porcinas, ese IC_{50} se comparó con el obtenido en una curva estándar utilizando IFN- α porcino ($4,62 \times 10^8$ U/mg) para calcular las unidades de actividad antiviral (U/ml).

Los ensayos de actividad antiviral contra FMDV se llevaron a cabo en el Laboratorio de Contención Biológica NSB-4 OIE perteneciente al Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET. La manipulación de VSV se llevó a cabo dentro de cabina de flujo laminar vertical.

Neutralización de IFN- α porcino

Diluciones de los sobrenadantes de CMSPs tratadas con BVs AcMNPV ($moi = 1$) y de IFN- α porcino estándar fueron tratados con anticuerpo monoclonal anti-IFN- α porcino (clon K9) por 1 h a temperatura ambiente antes de ser utilizados para tratar células MDBK para realizar el bioensayo de actividad antiviral.

Depleción de células NK

Para la depleción de células NK se utilizó anticuerpo anti-NK1.1 (PK136) purificado a partir de líquido ascítico de ratón por columna A sefarosa (GE Healthcare). La pureza se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie y se cuantificó la masa mediante Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Se inocularon 100 μ g en 300 μ l por animal por vía intraperitoneal (i.p.) y se reforzó la depleción con una dosis adicional. Los animales inoculados antes de la administración con BVs fueron reforzados con una dosis de anticuerpo el día 1 post inoculación. Todos los animales que sobrevivieron al día 3 post desafío recibiendo una dosis refuerzo de anticuerpo.

Evaluación de la depleción de células NK

Ratones inmunizados con anticuerpo anti-NK1.1 a distintos tiempos (1, 3 y 5 d) o sin inmunizar fueron sacrificados y se les extrajo el bazo. Se disgregaron separadamente en

medio RPMI suplementado con SFB 10 % (Natocor), 2- μ -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, glutamina 5×10^{-5} M (GlutaMAX, Gibco) y penicilina/ estreptomycin (100 U/ml y 100 μ g/ml) (Gibco) 10 % SFB (Natocor) y se centrifugaron los esplenocitos por 10 min a 180 x g. Para la lisis de glóbulos rojos, se resuspendieron las células en 500 μ l de Buffer Lisis RBC por 2 min, al término de los cuales se agregó medio RPMI completo 10% SFB. Se contabilizaron las células en cámara de Neubauer y se realizaron dos lavados en medio RPMI centrifugando a 1000 rpm para agregar 100 μ l con 1×10^6 células en pocillos de una placa de 96 pocillos fondo en V. Se realizaron dos lavados en BS y se resuspendieron en 50 μ l de BS con la dilución de anticuerpos dirigidos a moléculas ubicadas en la superficie celular (anti-CD3e, BD Biosciences, conjugado a FITC; anti-DX5, CD49b, BD Biosciences, conjugado a PE). Luego de incubar 40 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron las células dos veces con BS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4 % durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 μ l de PBS y se conservaron a 4 °C.

Inmunización y extracción de sangre de ratones con baculovirus

Para los distintos experimentos realizados, grupos de ratones fueron inoculados por vía intravenosa (i.v.) en el seno retro-orbital con 5×10^7 UFP de BVs de AcMNPV, volumen equivalente de mock de infección, ODVs en masa de VP39 equivalente a 5×10^7 UFP de BVs (ODVs 1X), ODVs en masa de VP39 equivalente a $2,5 \times 10^8$ UFP de BVs (ODVs 5X) o PBS en volumen equivalente. Se tomaron muestras de sangre de la vena lateral de la cola a las 3 h o 6 h post inoculación en tubos con heparina sódica. El plasma se separó por centrifugación a 1.500 x g por 10 min y se conservaron a -80 °C para la determinación de actividad antiviral e IFN- γ .

Desafío de ratones con FMDV

Para el desafío con FMDV, los ratones C57BL/6 fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 2×10^4 o 5×10^4 UFPs de FMDV A/Arg/01 dependiendo del

experimento. Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio de Contención Biológica NSB-4 OIE perteneciente al Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET.

Los ratones infectados con FMDV fueron evaluados diariamente en cuanto a un *score* clínico basado en la movilidad, la respuesta a estimulación manual, la dificultad para caminar, la presencia de temblores, la postura o la piloerección (Ver tabla M1). El valor de *score* clínico de 11 fue determinado como criterio de punto final.

Signos clínicos	Grado	Score
Inmovilidad o falta de respuesta a estimulación manual	Se mueve solo	0
	Se para y camina sólo si es tocado	2
	Se mueve poco si es tocado o sólo si se lo corre del lugar	5
	No realiza ningún movimiento ni al moverlo de lugar	11
Dificultad para caminar	Cuando camina lo hace normalmente	0
	Cuando camina lo hace lentamente	1
	Cuando camina lo hace muy torpemente	3
Temblores	No presenta temblores	0
	Presenta temblores leves	1
	Presenta temblores graves	3
Postura encorvada	No presenta postura encorvada	0
	Presenta postura encorvada	3
Piloerección	No se observa piloerección	0
	Se observa piloerección	1

Tabla M1: Se muestran los signos clínicos que se presentan habitualmente en ratones C57BL/6 durante estos desafíos y el score clínico que corresponde a su ausencia, su presencia o sus distintos grados de severidad.

Inmunización y extracción de sangre en cerdos

La inmunización de cerdos se realizó por la vena auricular de la oreja con 1×10^9 UFP de BVs de AcMNPV, en cerdos sedados con xilacina. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular externa inmediatamente antes de la inmunización (tiempo cero), y 3, 6 y 9 horas post-inmunización (hpi) utilizando citrato de sodio como anticoagulante. Se separó el plasma por centrifugación a $1.500 \times g$ por 10 minutos y se conservaron las muestras a -80°C para la determinación de actividad antiviral e IFN- α .

Cuidado y uso de animales

Todos los experimentos con ratones o cerdos fueron llevados a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (Assurance number A5802-01, Office of Laboratory Animal Welfare, NIH). El uso de los animales y los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del INTA Castelar (49/2013, 35/2015, 36/2015, 45/2017, 59/2017, 53/2018). Se utilizó isofluorano como método anestésico en ratones y sacrificio por inhalación de dióxido de carbono. Todos los métodos fueron seleccionados para minimizar el sufrimiento animal.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se realizó ANOVA y la prueba T de student mediante el programa informático GraphPad Prism.

Para la búsqueda de secuencias homólogas, el cálculo de homología y el E-valor se utilizó el programa informático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) provisto por *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Resultados

La inducción de un estado antiviral por los baculovirus se produce por la interacción de factores virales con el sistema inmune del hospedador. En esta tesis se abordó el estudio de esta interacción, por un lado, haciendo foco en la respuesta innata, estudiando qué rol cumple la activación de distintos componentes del sistema inmune en la protección otorgada por el BV de baculovirus. Por otro lado, se estudió qué factores virales, además de su genoma, son determinantes en esta interacción.

En una segunda instancia, se profundizó el estudio de su utilidad para el desarrollo de estrategias antivirales, evaluando la capacidad inmunoestimuladora de los BVs en una especie de interés pecuario, la especie porcina. También se abordaron estrategias biotecnológicas para la optimización del impacto de los baculovirus en la generación de actividad antiviral en células inmunes de cerdo.

Desarrollo de técnicas para evaluar IFNs

En el modelo murino, los BVs de baculovirus promueven la expresión de IFNs, principales intermediarios antivirales del sistema inmune innato. Los mecanismos involucrados en la acción de los IFNs han sido estudiados con profundidad, y se ha descrito que activan, a través de receptores presentes en la superficie de las células, la expresión de los principales genes involucrados en las respuestas antivirales. Con el fin de obtener herramientas para la detección de IFNs en sobrenadantes de cultivos celulares o muestras de suero de animales, se desarrollaron técnicas para la evaluación tanto cuantitativa como funcional de los mismos. Para ello, se realizaron *screenings* de condiciones experimentales para hallar las óptimas para el empleo en un ELISA de IFN- α porcino, así como en bioensayos de actividad antiviral.

Optimización de bioensayos de actividad antiviral:

Teniendo en cuenta que esta tesis tuvo como objetivo el empleo del baculovirus como inductor de un estado antiviral, en primer lugar se desarrolló un ensayo para evaluar la presencia de IFNs en base a su actividad biológica. Esta técnica consiste en utilizar muestras

incógnitas, provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares o sueros de animales, para tratar cultivos celulares susceptibles antes de una infección con VSV, un virus muy utilizado por su fácil manejo, su sensibilidad a los IFN y su rápida replicación en gran variedad de cultivos celulares de distintas especies. Posteriormente, las muestras fueron utilizadas para evaluar la presencia de mediadores antivirales que induzcan protección específicamente en células de origen porcino contra un desafío *in vitro* con FMDV.

Para la optimización del ensayo de actividad antiviral contra VSV, se evaluaron las líneas celulares IBRS-2 y MDBK (líneas celulares de fibroblastos de riñón porcino y bovino respectivamente), mientras que para el ensayo con FMDV se utilizó la línea celular LFBK (derivada de fibroblastos de riñón porcino). Las células IBRS-2 tienen como ventaja que poseen defectos en la producción de IFNs de tipo I [149].

Para optimizar las condiciones del ensayo, las células fueron tratadas con IFN- α porcino estándar. Luego del tratamiento, las células fueron infectadas con distintas multiplicidades de infección (moi) de VSV del serotipo Indiana en el caso de las células MDBK e IBRS-2, o con FMDV del serotipo O1Campos para las células LFBK, y se reveló a distintos tiempos post infección. Las condiciones óptimas establecidas fueron una moi = 3 de VSV por 24 h para las MDBK, una moi = 0,01 de VSV por 72 h para las IBRS-2 y una moi = 0,1 de FMDV por 24 h para las LFBK (Figura R1). Estas condiciones fueron seleccionadas para ser utilizadas en los ensayos ulteriores. Se decidió trabajar con células IBRS-2 y MDBK debido a que permiten sensar IFNs de cerdos, y, con el fin de unificar la técnica utilizada en esta tesis, se evaluó su sensibilidad a IFNs murinos. Los resultados demostraron que ambas líneas celulares son protegidas contra una infección con VSV luego del tratamiento, por lo que también fueron utilizadas para sensar IFNs en muestras de origen murino.

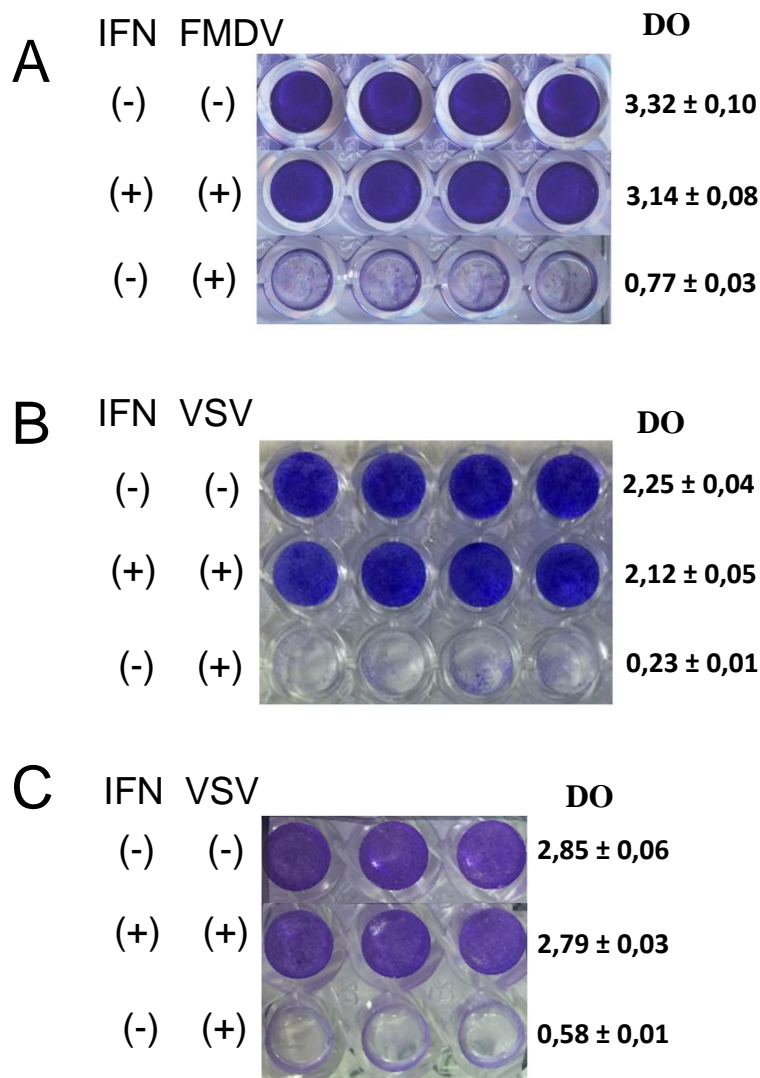


Figura R1. Optimización de los ensayos de actividad antiviral. Imagen ilustrativa del ensayo realizado con células LFBK (A), IBRS-2 (B) o MDBK (C) sembradas en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de IFN- α porcino e infectadas 16 h después con FMDV O1Campos (A) o VSV del serotipo Indiana (B, C). En la figura se observan las placas reveladas en las condiciones óptimas determinadas. A la derecha de cada figura se muestran las medias de densidad óptica (DO) (595 nm) con su error estándar.

Debido a que en este trabajo se utilizan sobrenadantes de células de mamífero tratadas con baculovirus, nos propusimos estudiar si la presencia residual de estos virus podría ser responsable de generar actividad antiviral. Con este fin, cultivos celulares de MDBK y LFBK se trataron directamente con BVs. El ensayo en células MDBK mostró bajos niveles de protección a una moi de 9 pero no de 4, mientras que en células LFBK se observaron efectos leves a una moi de 3 pero

no de 1 (Tabla R1). Estos resultados sugieren que para tener efectos directos en el ensayo de actividad antiviral se requiere un alto contenido de baculovirus contaminantes en las muestras. Sin embargo, se decidió preventivamente centrifugar las muestras antes de ser utilizadas y titular la presencia del virus para asegurar su ausencia. Las titulaciones de estas muestras dieron como resultado niveles indetectables de virus en todos los ensayos de esta tesis.

MOI	DO	MOI	DO
284	1,734	100	2,757
142	1,717	50	2,621
70.8	1,724	25	2,033
35.4	1,701	12.5	1,852
17.7	1,841	6.3	0,594
8.9	0,146	3.1	0,278
4.4	0	1.6	0

Tabla R1. Evaluación del efecto antiviral directo inducido por BV en células MDBK y LFBK. Se sembraron células MDBK (izquierda) o LFBK (derecha) en placas de 96 pocillos en presencia de diluciones seriadas de BVs de AcMNPV y a las 16 h se infectaron con VSV del serotipo Indiana o FMDV O1Campos. Veinticuatro horas después se fijaron, se tñieron con cristal violeta y se resuspendió el colorante. Se midió la DO (595 nm) y a todos los valores se les restó la densidad óptica de pocillos control donde sólo se infectó con VSV o FMDV, para así poder evaluar el nivel de protección.

Los resultados de actividad antiviral se expresaron como la inversa de la dilución en la cual se protege el 50% de los pocillos, es decir la concentración de inhibición media (IC_{50}). En el caso de muestras de origen porcino, la dilución a la cual se alcanza el IC_{50} se comparó con la de una curva estándar de IFN- α porcino (RnD System), lo cual permitió cuantificar las unidades de IFN- α /ml (U/ml) equivalentes.

De esta manera, se hallaron las condiciones experimentales óptimas para poder cuantificar la presencia de mediadores antivirales capaces de inducir protección, descartando posibles efectos directos de baculovirus residuales en las muestras.

Optimización de un ELISA para IFN- α porcino:

Con el fin de poder cuantificar IFNs de tipo I porcinos, se optimizaron las condiciones para llevar a cabo un ELISA *sándwich* para la detección de IFN- α porcino. Con este fin, se

utilizó un anticuerpo monoclonal contra IFN- α porcino (clon K9) como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal contra IFN- α porcino hecho en conejo como anticuerpo de detección. Como anticuerpo secundario fue utilizado un anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP y TMB fue elegido como sustrato para el revelado. Los ensayos fueron realizados utilizando distintas condiciones en cuanto a bloqueo, diluciones de los distintos anticuerpos, diluciones de las muestras a evaluar y tiempos, y se eligieron aquellas en las que se obtuvo la mínima absorbancia en el blanco, una absorbancia media en valores bajos de IFN- α , y una absorbancia alta al utilizar la concentración más elevada de la citoquina. En la figura R2 se muestra la curva realizada con IFN- α estándar obtenida en las condiciones finales (ver sección Materiales y Métodos). Para la realización de los experimentos se escogió el rango de concentraciones de IFN- α en el que la linealidad de la curva se ajustara a valores de R^2 de al menos 0,97.

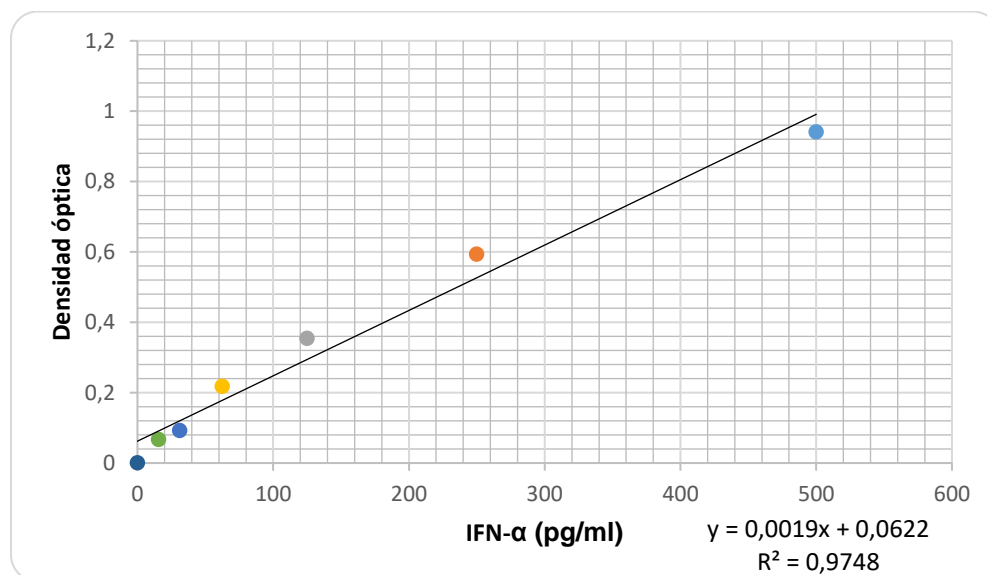


Figura R2. Curva de la absorbancia obtenida en el ELISA en función de la masa de IFN- α presente en la muestra. Se realizó el ensayo de ELISA en las condiciones determinadas como óptimas. Se muestra la curva de DO (595 nm) obtenida en función de la concentración de IFN- α porcino estándar.

Estudio del rol del sistema inmune innato en la inducción del estado antiviral inducido por los BVs en ratones

En esta tesis se estudiaron en primer lugar los mecanismos mediante los cuales BV de AcMNPV induce un estado antiviral en mamíferos utilizando el FMDV en el modelo murino. Dado que las respuestas antivirales a tiempos cortos están determinadas por el sistema inmune innato, y que los IFNs de tipo I y II son los mediadores antivirales de mayor relevancia, en este trabajo se abordó el estudio de su rol en el desarrollo del estado antiviral promovido por baculovirus. Además, las células NK cumplen un papel destacado en el control de las infecciones virales, son importantes productoras de citoquinas, secretando grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α , y destruyen células infectadas mediante su actividad citotóxica. Por lo tanto, también se evaluó su importancia para lograr la protección de ratones contra FMDV.

Rol de los IFNs de tipo I en la inducción de un estado antiviral *in vivo*

En primer lugar se propuso estudiar el efecto que genera la falla funcional del sistema de IFNs de tipo I en la inducción del estado antiviral por la acción del BV en el modelo murino. En esta especie, además de la existencia de 14 genes funcionales de IFN- α , se expresan IFN- β , κ , ϵ y limitina, pero todas estas variantes de IFNs tipo I actúan a través del mismo receptor celular (IFNAR). Por lo tanto, la forma más sencilla de estudiar el rol de estos IFNs es utilizando una cepa KO para el gen que codifica la subunidad IFNAR1 de este receptor (IFNAR1^{-/-}). En estos ratones, los IFNs de tipo I son incapaces de inducir la expresión de los ISGs, así como de promover el aumento de su propia expresión.

Grupos de cuatro ratones IFNAR1^{-/-} fueron inmunizados por vía i.v. con BV o con *mock* infección, 72 h antes de un desafío con FMDV A/Arg/01. Como control se utilizaron grupos de ocho ratones de la cepa C57BL/6, inmunizados de la misma manera con BV o *mock* infección. El esquema de inmunización se grafica en la Figura R2. Para estudiar si la inducción de mediadores antivirales depende del IFNAR, se evaluaron los niveles de actividad antiviral contra VSV y de IFN- γ por ELISA en muestras de suero tomadas a las 3

h post inmunización con BV. Seguidamente, con el objetivo de evaluar su efecto en la protección contra FMDV, se realizó un seguimiento diario de los signos clínicos y el estado general del animal, otorgando un puntaje o *score* clínico tal como se describió en la sección Materiales y Métodos, siendo el puntaje 11 el criterio de punto final. Asimismo, se estudió el índice de sobrevida.

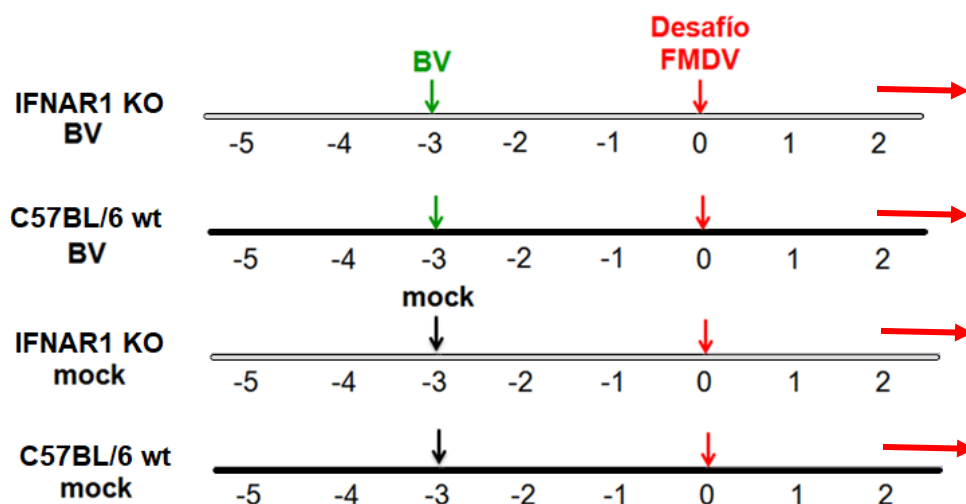


Figura R3: Esquema de inmunización para el estudio del rol de los IFNs de tipo I en el establecimiento de un estado antiviral en ratones. Dos grupos de ratones C57BL/6 wt y 2 grupos de ratones IFNAR1^{-/-} fueron desafiados con FMDV mediante una inoculación por vía i.p. al día 0. Uno de los grupos de ratones wt y uno de los IFNAR1^{-/-} recibieron BV i.v. 3 días antes del desafío, mientras que los otros mock de infección. Se evaluaron los signos clínicos y el índice de sobrevida post desafío.

Los ensayos realizados permitieron detectar actividad antiviral contra VSV en el *pool* de sueros de ratones IFNAR1^{-/-} que recibieron BV, aunque los niveles tendieron a ser inferiores con respecto a ratones wt (Tabla R2). Por otro lado, al evaluar la presencia de IFN- γ en los sueros de los ratones carentes del receptor para IFNs de tipo I, no se detectaron diferencias significativas con respecto a los sueros de ratones wt (Figura R4). Estos resultados sugieren que la inducción de IFNs de tipo I, pero no de IFNs de tipo II, depende parcialmente de la señalización a través del IFNAR

Cepa	Inóculo	Actividad antiviral contra VSV (IC ₅₀)*
C57BL/6 wt	mock	<4
C57BL/6 wt	BV	47,6
IFNAR1 ^{-/-}	mock	<4
IFNAR1 ^{-/-}	BV	16,8

Tabla R2: Actividad antiviral inducida por baculovirus en ratones C57BL/6 wt o IFNAR1^{-/-}. Ratones C57BL/6 wt o IFNAR1^{-/-} fueron inoculados i.v. con mock de infección o BVs y se colectaron los sueros a las 3 h. A partir de *pools* de sueros, se evaluó la actividad antiviral contra VSV en células MDBK.

*Coeficiente de dilución correspondiente al IC₅₀ del suero.

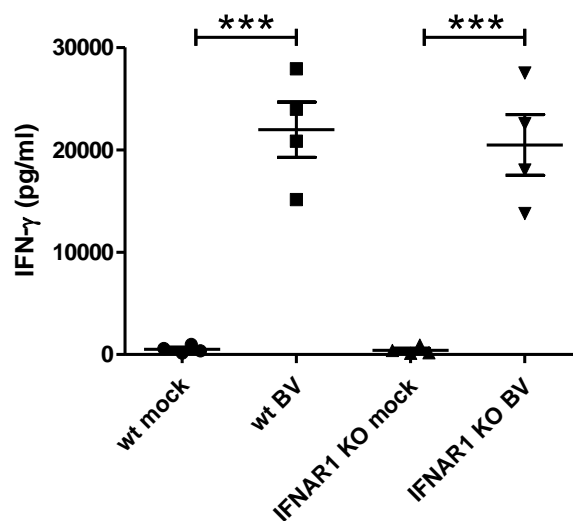


Figura R4: Valores de IFN- γ en ratones C57BL/6 wt o IFNAR1^{-/-} inmunizados con BVs. C57BL/6 wt o KO para IFNAR1 fueron inoculados i.v. con mock de infección o BVs y se colectaron los sueros a las 3 h. Se evaluaron los niveles de IFN- γ por ELISA. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student; ***, $p < 0.001$.

Una vez desafiados con 2×10^4 UFPs de FMDV, todos los grupos inoculados con *mock* desarrollaron una enfermedad severa, evidenciada por los signos clínicos (Ver en Tabla A1 en Anexo), que llevó al 100% de mortalidad el día 2 post desafío. Mientras tanto, los ratones wt inoculados con BV no mostraron signo clínico alguno durante los siete días de observación y en el caso de los ratones IFNAR1^{-/-} inmunizados con BV, la mortalidad del 100% se alcanzó a la semana (Figura R5).

Estos resultados evidencian la importancia de los IFNs de tipo I para lograr la protección efectiva contra FMDV, aunque el retraso en la mortalidad sugiere la existencia de otros factores importantes en la respuesta antiviral.

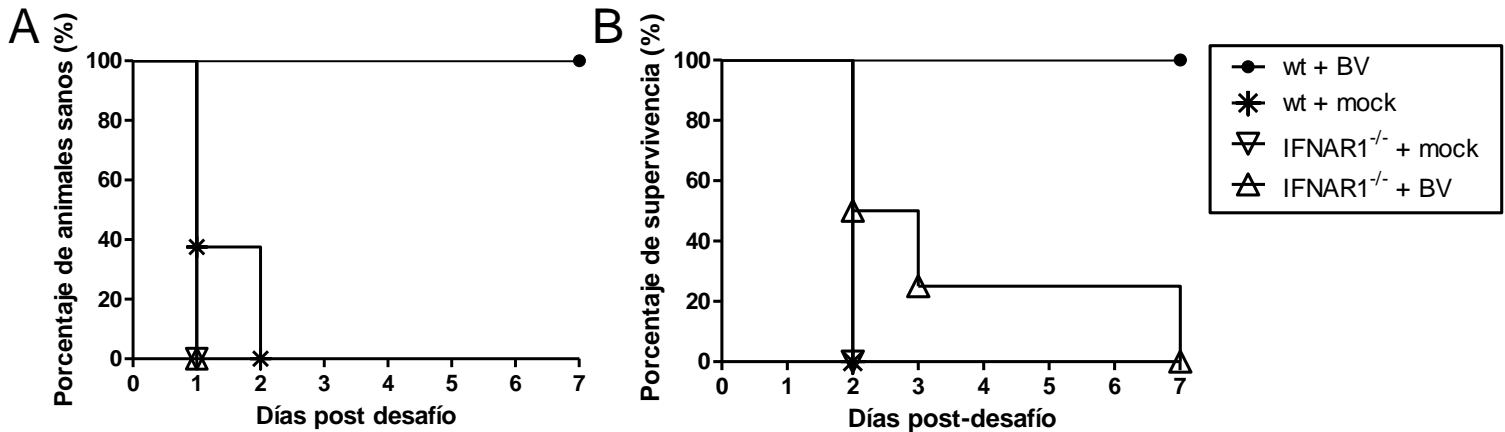


Figura R5: Estudio del rol de los IFNs de tipo I en el estado antiviral inducido por BVs en ratones. Grupos de ratones hembra de entre 8 y 9 semanas de edad de la cepa C57BL/6 wt (n = 8) o IFNAR1^{-/-} (n = 4) fueron inoculados i.v. con *mock* infección o BVs y desafiados con 2x10⁴ UFPs de FMDV a las 72 h con el esquema de inmunizaciones mostrado en la Figura R3. Los ratones fueron monitoreados diariamente por siete días y se evaluaron los signos clínicos y el índice de sobrevida. Se muestra la curva de manifestación de la enfermedad (A) y la curva de supervivencia (B). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Rol de las células NK en la inducción de un estado antiviral *in vivo*

Para estudiar si el estado antiviral promovido por los baculovirus es dependiente de la acción de las células NK, se abordó un experimento en ratones en el que se estudió la respuesta BV en ausencia de estas células. Con este fin, se depletó específicamente la población de células NK1.1⁺ que incluye la mayor parte de las células NK y parte de las células NKT, utilizando el anticuerpo anti-NK1.1 (PK136). Se diseñaron dos esquemas de inmunización con el objetivo de estudiar, por un lado, la relevancia de las células NK exclusivamente durante el desafío con FMDV y, por otro lado, su importancia en el desarrollo de la respuesta antiviral inducida por baculovirus.

En primer lugar se puso a punto la cinética de la depleción de las células NK (ver en Figura A2 en sección Anexo). Luego de la administración del anticuerpo anti-NK1.1, se alcanzó la depleción de células NK a las 24 h, la que se mantuvo durante los cinco días

evaluados. Por lo tanto, se decidió incluir dos dosis en el esquema de inmunización para asegurar el mantenimiento de la depleción durante todo el ensayo.

Para la realización de este experimento, se diseñó el esquema de inmunizaciones con cinco grupos de ratones mostrado en la Figura R6. Los ratones fueron inoculados con BVs o *mock* infección y se tomaron muestras de sangre a las 3 horas post inmunización para evaluar el efecto de la depleción de las células NK en la inducción de IFNs. Para ello, se realizó un ELISA de IFN- γ y un ensayo de actividad antiviral contra VSV. Luego de 72 h, se llevó a cabo el desafío con FMDV siguiendo diariamente los signos clínicos y el estado general del animal, para otorgar el *score* clínico y calcular el índice de supervivencia.

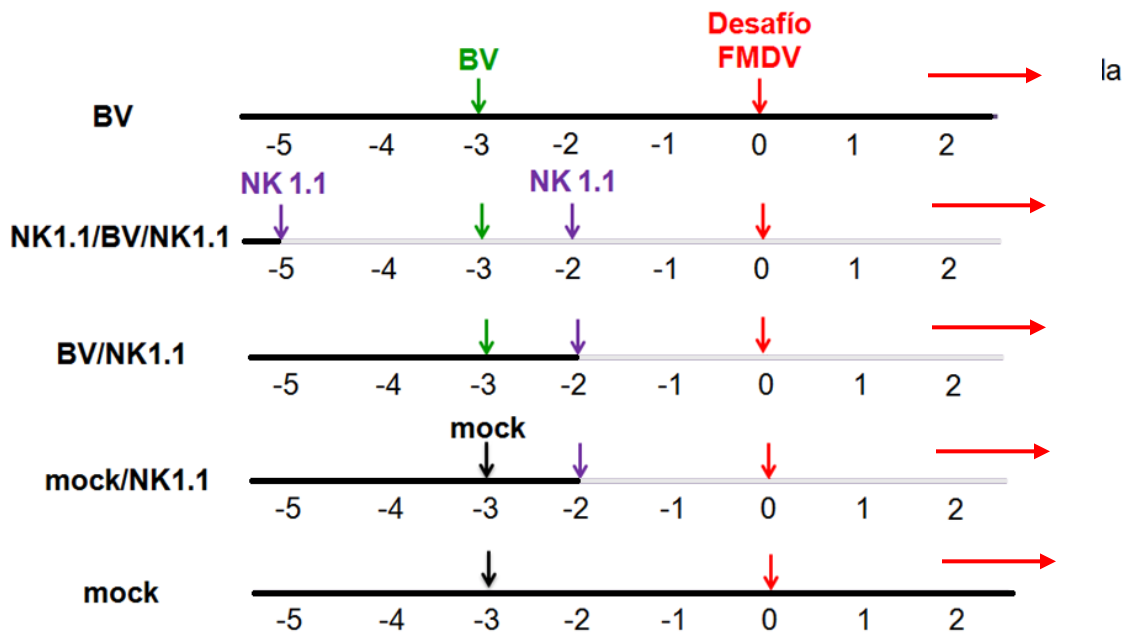


Figura R6 Esquema de inmunización para el estudio de la relevancia de las células NK en el establecimiento de un estado antiviral en ratones. Cinco grupos (n=8) de ratones C57BL/6 fueron desafiados con FMDV (2×10^4 UFPs) mediante una inoculación al día 0 por vía i.p. Las inmunizaciones se realizaron como se muestra en el esquema. La dosis de anticuerpo monoclonal anti-NK1.1 (100 μ g) fue administrada por vía i.p. y la dosis de BVs (5×10^7 UFPs) o de *mock* infección (volumen equivalente) fue inoculada por vía i.v.

Los resultados de este experimento mostraron que la depleción de células NK condujo a que los ratones estimulados con BVs expresaran niveles significativamente inferiores de IFN- γ (Figura R7). Por otro lado, la actividad antiviral detectada en suero de estos ratones

fue similar, sugiriendo que la expresión de IFNs de tipo I no habría sido alterada por la depleción.

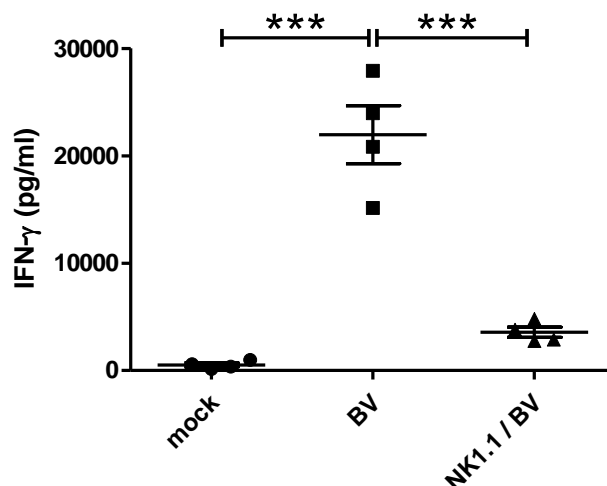


Figura R7: Valores de IFN- γ en ratones C57BL/6 con depleción de células NK inmunizados con BVs. Ratones C57BL/6 recibieron una dosis i.p. de anticuerpo anti-NK1.1 48 h antes de ser inmunizados por vía i.v. con mock de infección o BVs. Los sueros se colectaron a las 3 h y se evaluaron los niveles de IFN- γ por ELISA. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student; ***, $p < 0.001$.

Inóculo	Actividad antiviral contra VSV (IC ₅₀)*
mock	<4
BV	47,6
NK1.1 / BV	40

Tabla R3: Actividad antiviral en ratones C57BL/6 con depleción de células NK inmunizados con BVs. Ratones C57BL/6 recibieron una dosis i.p. de anticuerpo anti-NK1.1 48 h antes de ser inmunizados por vía i.v. con mock de infección o BVs. Los sueros se colectaron a las 3 h y, a partir de *pools*, se evaluó la actividad antiviral contra VSV en células MDBK.

*Coeficiente de dilución correspondiente al IC₅₀ del suero.

Este ensayo demuestra que la producción IFN- γ por estímulo de BV depende de las células NK, pero que la inducción general de un estado antiviral *in vivo* no se ve afectada por la depleción de estas células.

Luego del desafío con FMDV, el 100% de los ratones inoculados con *mock* murió el día 2, mientras que el 100% de los ratones que habían recibido BV antes del desafío sobrevivió y los animales no presentaron ningún signo clínico durante los 7 días de observación. La disminución en el número de células NK durante todo el experimento dio como resultado que la totalidad de los animales desarrollen enfermedad, mostrando el mayor *score* clínico promedio (4,75) el día 4 (Ver en Tabla A2 en sección Anexo) aunque la mortalidad fue del 12,5%. Por otro lado, la disminución en el número de células NK únicamente durante el desafío viral no afectó la sobrevida, pero algunos de estos animales presentaron signos clínicos con un *score* clínico promedio máximo (1,25) el día 2.

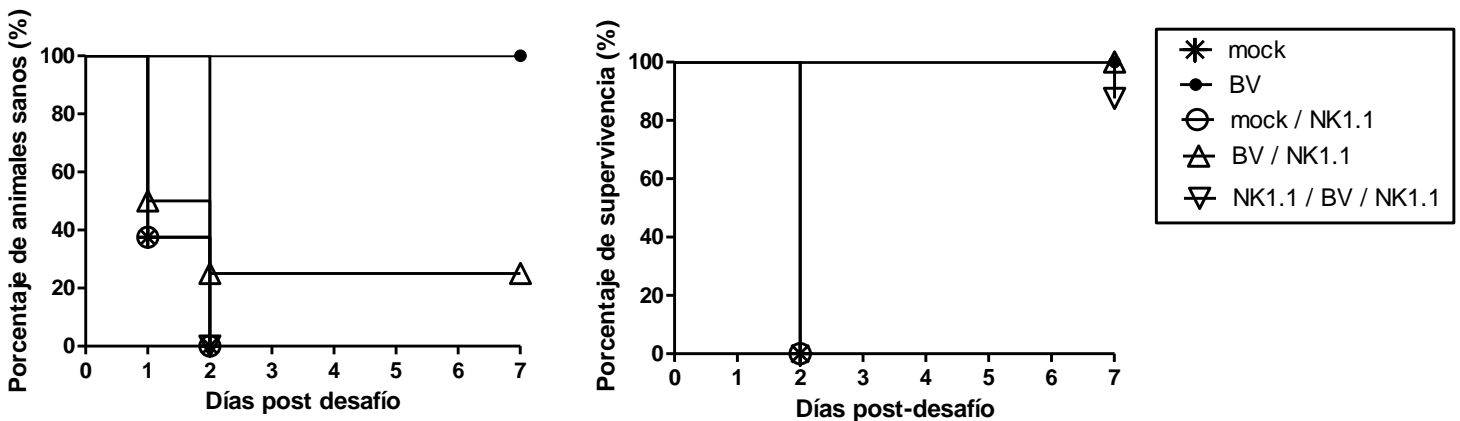


Figura R8: Estudio del rol de las células NK en el establecimiento de un estado antiviral en ratones. Grupos de ratones (n = 8) de entre 8 y 9 semanas de edad hembras de la cepa C57BL/6 wt fueron inoculados i.p. con anticuerpo anti-NK1.1, i.v. con mock de infección o BVs y desafiados con 2×10^4 UFPs de FMDV a las 72 h según el esquema de inmunización mostrado en la Figura R6. Los ratones fueron monitoreados diariamente por 7 días y se evaluaron los signos clínicos y el índice de sobrevida. Se muestra la curva de manifestación de la enfermedad (A) y la curva de supervivencia (B). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

En conjunto, los resultados obtenidos mostraron que las células NK tienen un rol importante en la protección contra FMDV inducida por el BV. Si bien la presencia de las células NK1.1⁺ durante el desafío viral no fue imprescindible para la sobrevida de los animales inoculados con BVs, sí resultó importante para evitar la manifestación de la enfermedad. Por otro lado, la depleción de las células NK durante todo el experimento,

agravó la enfermedad y afectó el índice de supervivencia de los animales inmunizados con baculovirus, indicando que son un factor importante de la inmunidad innata para montar este estado antiviral.

Estudio de los factores virales determinantes para la inducción de una respuesta antiviral

El impacto directo de BV en células inmunes es un paso clave en la inducción del estado antiviral en ratones. El genoma baculoviral activa la vía TLR9/MyD88 debido a su alta frecuencia de motivos CpG y también vías dependientes de STING. El encuentro con el TLR9 debe suceder en compartimentos endosomales ácidos a los que hayan sido reclutados estos receptores para poder dar lugar a la activación de la cascada de señalización dependiente de MyD88. Contrariamente, la activación de vías dependientes de STING debe darse luego del escape del BV al citoplasma, donde su genoma estará disponible para sensores de ADN citosólico. Además del genoma, que fue descrito como el PAMP responsable de activar la respuesta inmune, existen otros factores virales que pueden ser importantes en la interacción con células de mamíferos para inducir un estado antiviral.

Estudio de BV como vehículo de ADN en células inmunes

Los ODVs, los viriones del fenotipo ocluido de baculovirus, poseen entre 1 y 15 nucleocápsides por partícula, cada una de ellas muy similar a la de los BVs. Ambos fenotipos contienen el mismo genoma pero difieren en la naturaleza y composición de su envoltura (Figura R9 A). Previamente al desarrollo de esta tesis, se desconocía si los ODVs eran capaces de inducir un estado antiviral en ratones como los BVs. Por esta razón, consideramos que comparar los efectos en el modelo murino de ambos viriones que poseen diferencias en la envoltura pero que contienen el mismo genoma y, por lo tanto, los mismos PAMPs sería útil para profundizar los conocimientos acerca de la importancia del BV como vector, vehiculizando el ADN y logrando la activación del sistema inmune innato.

Purificación y caracterización de los viriones ocluidos

Los ODVs de AcMNPV fueron purificados a partir de una infección tardía de células Sf9 mediante disolución de los poliedros y separación por centrifugación de las partículas no disueltas. Por otro lado, los BVs fueron obtenidos a partir de sobrenadantes de infecciones tempranas. Se caracterizó la identidad fenotípica de los stocks virales por Western blot, evaluando la presencia de la proteína mayoritaria de cápside VP39, la proteína mayoritaria de envoltura del BV GP64 y la proteína mayoritaria de envoltura de ODVs P74 con anticuerpos específicos (Figura R9 B). En la figura puede observarse la detección de la proteína VP39 en ambos *stocks* virales, mientras que P74 y GP64 se detectaron exclusivamente en las partículas virales de ODV o BV, respectivamente. De esta manera, se detectaron proteínas de envoltura de las partículas virales de ODV y BV presentes en los respectivos *stocks* virales y no se detectó contaminación cruzada.

Para contribuir con la caracterización del *stock* de ODVs, se reveló por microscopía electrónica de transmisión la presencia de viriones envueltos, demostrando así su integridad. Los ODVs examinados tuvieron en promedio 78 ± 26 nm de grosor y 270 ± 21 nm de largo. Se muestran partículas virales representativas en la Figura R9 C.

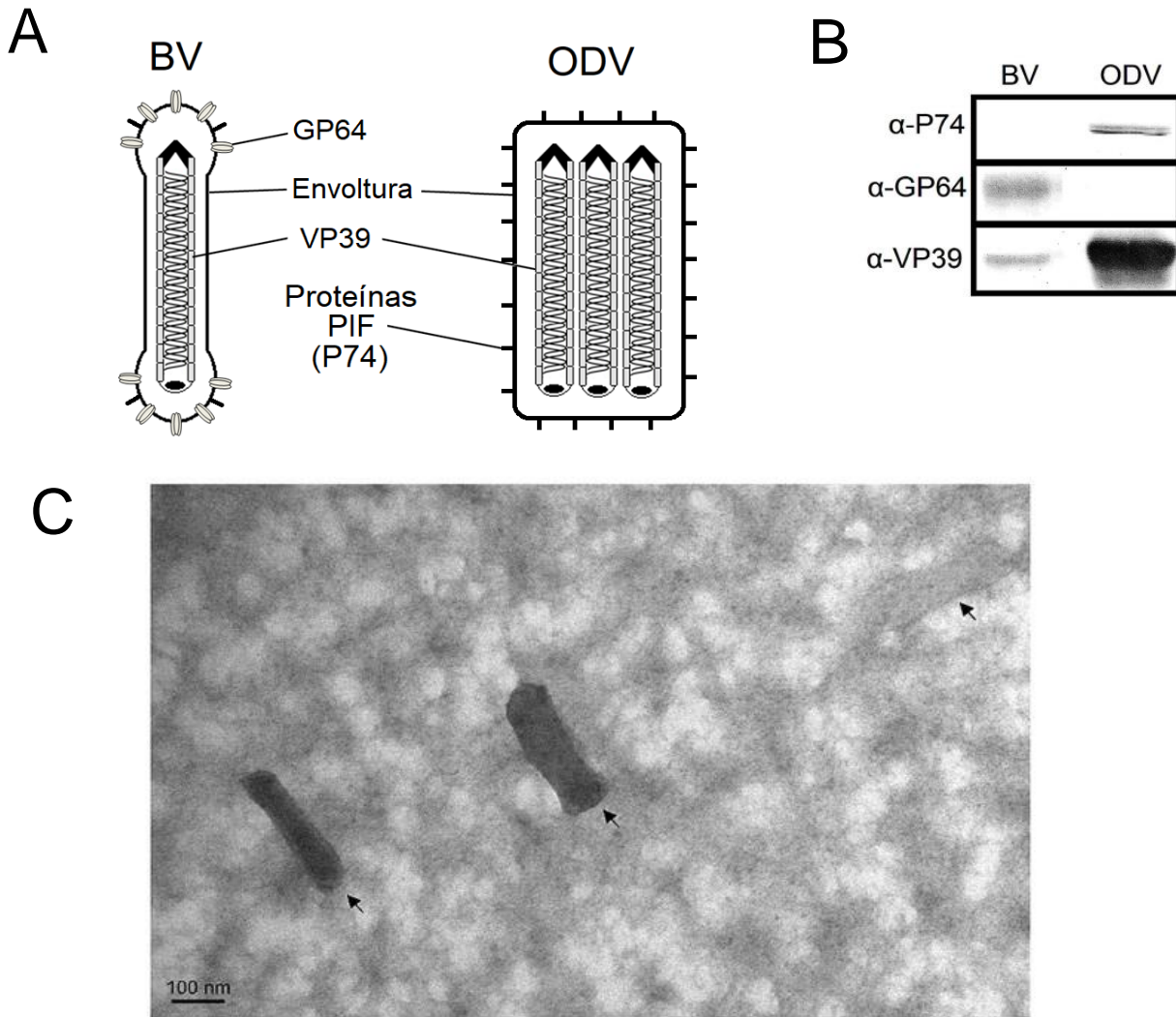


Figura R9. Caracterización de los ODVs purificados. (A) Representación esquemática de la estructura de ambos fenotipos de baculovirus. La principales proteínas de cápside y envoltura están indicadas. (B) Análisis comparativo por Western blot entre BVs y ODVs. Las proteínas fueron detectadas con anticuerpos monoclonales específicos anti-P74, anti-GP64 y anti-VP39. (C) Microscopía electrónica de transmisión de los ODVs. ODVs purificados fueron adsorbidos a una grilla de cobre, teñidos con 2% de acetato de uranilo y observados a un aumento de 85.000 x. Los viriones mostrados son representativos de todos los ODVs examinados. Barra = 100 nm.

De esta manera, se caracterizaron los *stocks* virales obtenidos, demostrando que las partículas de ODVs se encuentran envueltas y descartando la contaminación cruzada entre *stocks*.

Evaluación de la capacidad de los ODVs para inducir actividad antiviral en ratones

Para evaluar si los viriones de ambos fenotipos inducen un estado antiviral, ratones C57BL/6 fueron inoculados por vía i.v. con BVs u ODVs en distintas concentraciones y se tomaron muestras de suero a las 6 h. Se evaluó la actividad antiviral en estos sueros mediante el bioensayo de protección contra VSV. Los resultados mostraron que los sueros provenientes de ratones inmunizados con BVs tuvieron altos niveles de actividad antiviral, mientras que los sueros de ratones inoculados con ODVs fueron incapaces de inducir protección en las condiciones ensayadas (Tabla R3).

Inóculo	Actividad antiviral contra VSV (IC ₅₀)*
PBS	<4
BV	45,25
ODV 1X	<4
ODV 5X	<4

Tabla R4: Actividad antiviral inducida por los distintos fenotipos de baculovirus en ratones. Ratones C57BL/6 fueron inoculados i.v. con PBS, BVs y ODVs en dos concentraciones y se colectaron los sueros a las 6 h. Se evaluó la actividad antiviral contra VSV en células IBRS-2. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

*Coeficiente de dilución correspondiente al IC₅₀ del suero.

Adicionalmente, para estudiar la expresión de IFNs de tipo II, se evaluó la producción de IFN- γ en los sueros de ratones obtenidos en este experimento por ELISA. Los resultados permitieron observar que los BVs indujeron altos niveles a las 6 horas post inmunización, mientras que en los sueros extraídos de ratones inoculados con ODVs fue indetectable (Figura R10).

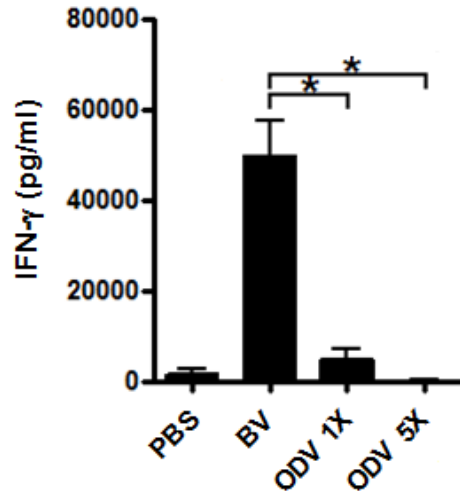


Figura R10: Valores de IFN- γ en ratones inmunizados con ODVs. Ratones C57BL/6 fueron inoculados i.v. con PBS, BVs y ODVs en dos concentraciones distintas y se colectaron los sueros a las 6 h. Se ensayó la actividad antiviral en los sueros. Los niveles de IFN- γ fueron evaluados por ELISA. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student; *, $p < 0.05$.

En conjunto, estos resultados indican que los ODVs, a pesar de vehicular el mismo genoma que los BVs, no son capaces de inducir la producción de IFNs en ratones *in vivo*.

Análisis comparativo del destino intracelular de BVs y ODVs

Las cDCs tienen un rol principal en la respuesta inmune innata. Trabajos previos demostraron que los BV impactan directamente en ellas a través de las vías de activación anteriormente mencionadas y que, en ausencia de este tipo celular, los BVs no pueden inducir la producción sistémica de citoquinas pro-inflamatorias, necesarias para la activación de otras células como las NK, ni IFNs [71]. Además, habíamos visto previamente que los ODVs, a diferencia de los BVs, no son capaces de inducir la maduración de estas células, ni en el aumento en la expresión de marcadores fenotípicos de maduración (CD86 y MHC II) ni de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6) [150]. Debido a su rol central en la inmunidad innata y a las diferentes capacidades de activación observadas entre los fenotipos, se decidió estudiar si

era posible detectar a los ODVs y BVs en BMDCs diferenciadas con GM-CSF mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal, comparando su tráfico intracelular. Para ello, se estudió la colocalización con LAMP2, un marcador de compartimentos tardíos y lisosomales, y con un marcador de vesículas ácidas (LysoTracker).

Al revelar la inmunofluorescencia con anticuerpo anti-VP39, la proteína de cápside, se pudieron observar tanto los BVs como los ODVs en las células y 1 hora post infección se encuentran en vesículas LAMP2⁺ y LysoTracker⁺ (Figura R11). Estos resultados sugieren que tanto los BVs como los ODVs son capaces entrar en las BMDCs y alcanzar endosomas tardíos o lisosomas.

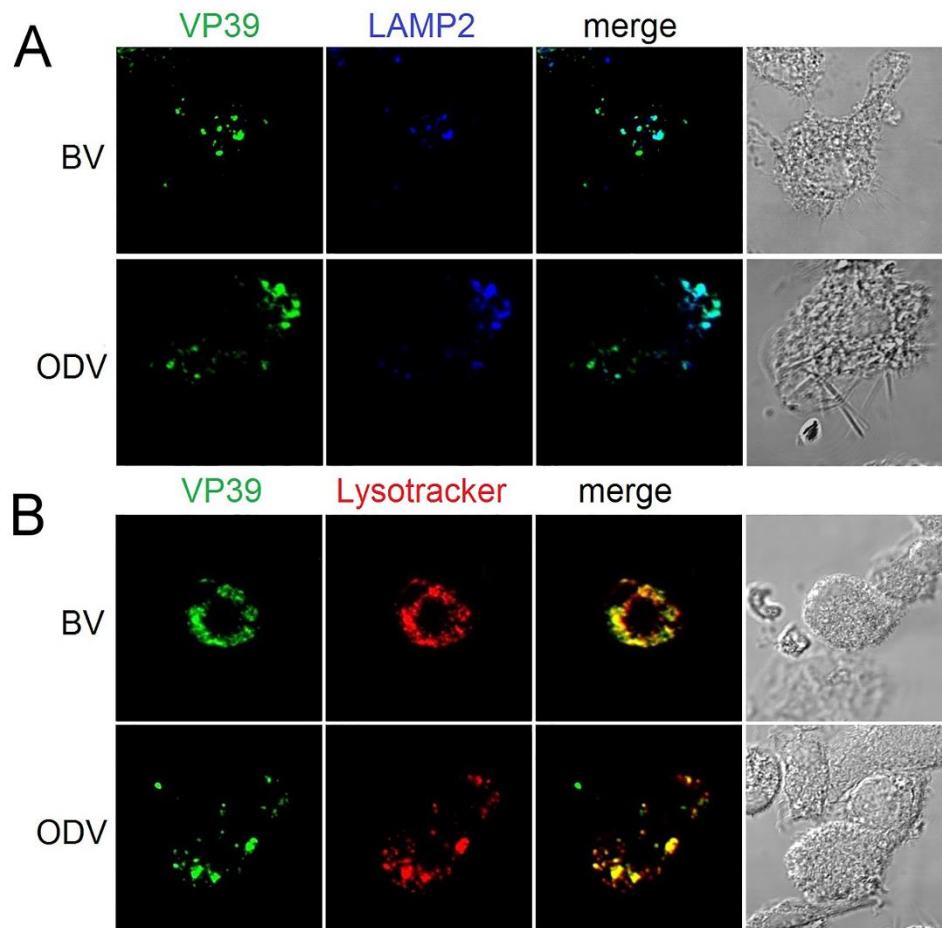


Figura R11. Análisis de colocalización de BVs y ODVs con marcadores lisosomales en BMDCs. BMDCs inmaduras fueron tratadas con BVs u ODVs a 37°C por (A) 1 h o (B) 1:15 h y luego fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpos específicos. Todos los análisis fueron realizados por microscopía confocal. LysoTracker DND-90 es mostrado en rojo, VP39 en verde y LAMP2 en azul.

A pesar de haber detectado ODVs en compartimentos ácidos, su degradación no estaba demostrada, condición necesaria para que el genoma quede desnudo y disponible para ser sentido por los receptores TLR9. Para estudiar si los viriones de los dos fenotipos baculovirales alcanzan compartimentos degradativos en BMDCs, se utilizó como marcador la proteína OVA conjugada a una molécula que sólo emite fluorescencia al sufrir un clivaje proteolítico (DQ-OVA). Luego de incubar las células con BVs u ODVs por 3 h y realizar una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-VP39, se analizó la colocalización por microscopía confocal. A diferencia de los ODVs, los BVs colocalizaron fuertemente con DQ-OVA (Figura R12). Esto indica que los BVs vehiculizan las nucleocápsides a compartimentos distintos que los ODVs, evidenciando que algún componente estructural diferencial de este virión determina su destino en vesículas degradativas DQ-OVA⁺.

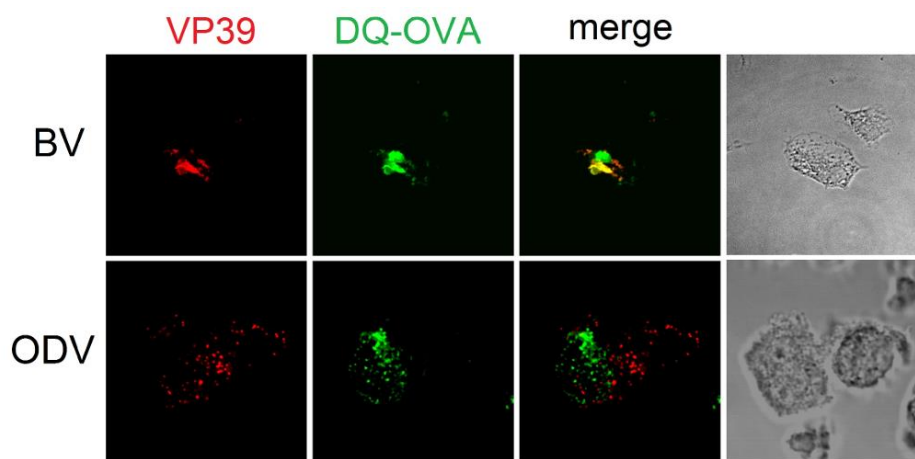


Figura R12. Análisis de colocalización de BVs y ODVs con compartimentos degradativos en BMDCs. BMDCs inmaduras fueron incubadas con BVs u ODVs junto con DQOVA por 3 h. Luego de fijar y permeabilizar se marcaron las células con anticuerpos específicos contra VP39 (rojo). DQ-OVA es mostrada en color verde.

Debido a que el destino intracelular de los ODVs podría contener enzimas proteolíticas pero ser distinto al de DQ-OVA, decidimos comparar el tráfico endosomal de ambos fenotipos baculovirales con el de la proteína OVA marcada con FITC (OVA-FITC). Con este fin, se incubaron BMDCs con OVA-FITC y BVs u ODVs para realizar la misma

comparación con el anticuerpo anti-VP39 por microscopía confocal. El antígeno modelo OVA y los viriones fueron internalizados en vesículas individuales (Figura R13 A, B). Luego, OVA y los BVs, pero no los ODVs, confluyeron a un compartimento endosomal común, colocalizando marcadamente a los 75 min (Figura R13 C).

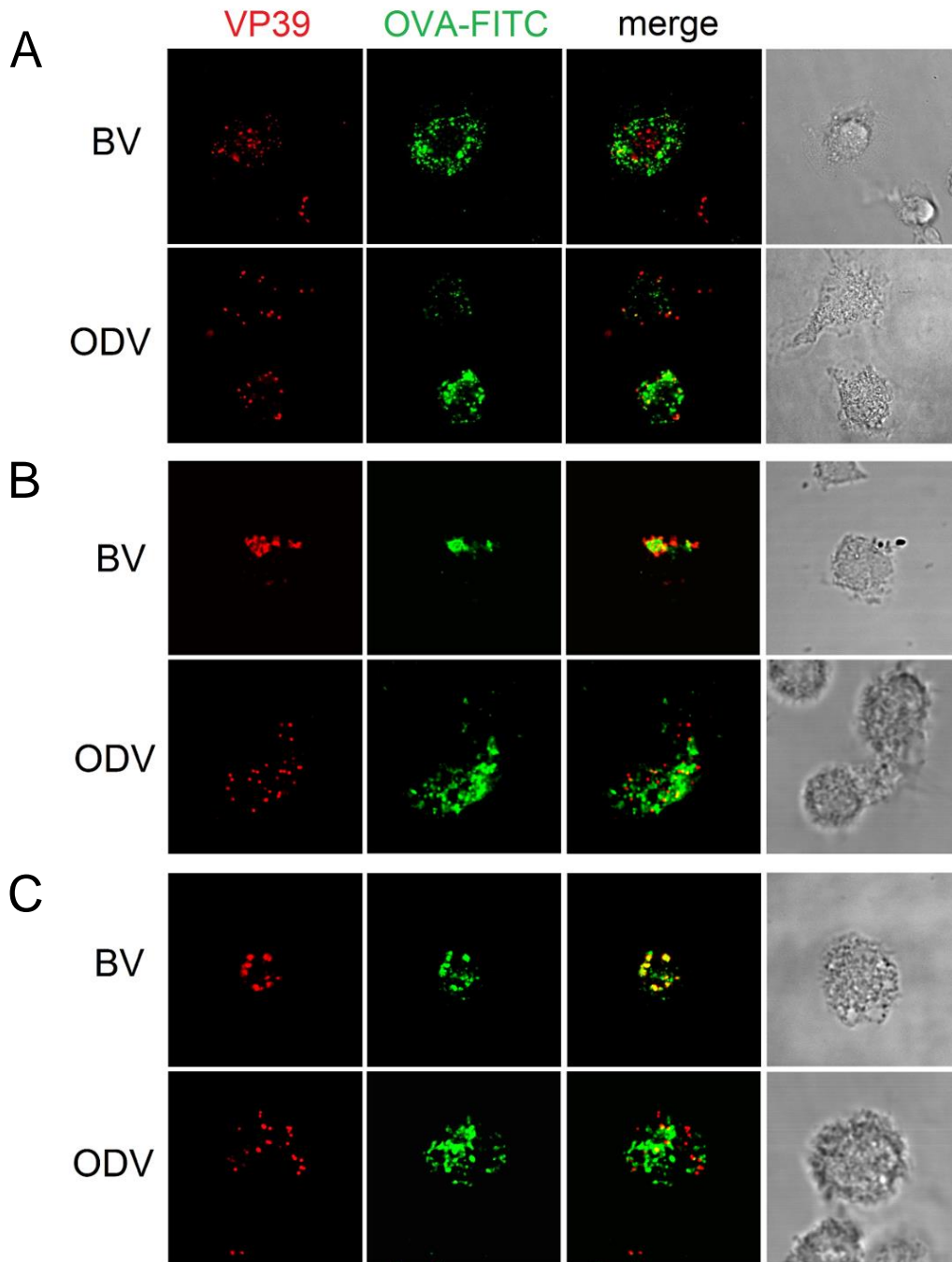


Figura R13. Análisis de colocalización de BVs y ODVs con la proteína OVA en BMDCs. BMDCs inmaduras fueron tratadas con BVs u ODVs junto con OVA-FITC por (A) 10 min, (B) 40 min o (C) 75 min. Luego de la fijación y permeabilización las células fueron marcadas con anticuerpos específicos contra VP39 (rojo). OVA-FITC es mostrada en color verde.

Estos resultados demuestran que los BVs comparten su destino con la proteína OVA, alcanzando compartimentos que presentan enzimas degradativas, mientras que los ODVs siguen un tráfico endosomal distinto bajo estas condiciones experimentales. La diferencia en el destino intracelular podría explicar las diferencias en las capacidades inunoestimuladoras de ambos viriones.

Estudio del rol de GP64 en la inducción de actividad antiviral por BVs en BMDCs

Como fue mencionado anteriormente, una de las principales diferencias entre los viriones es la presencia de GP64 en los BVs. La falta de esta proteína en la envoltura de los ODVs podría explicar que estos viriones no puedan escapar del endosoma y activar vías dependientes de sensores de ADN citosólicos. Sin embargo, es interesante que a pesar de alcanzar vesículas endocíticas, tampoco induzcan la maduración de la célula por vías dependientes de TLR9/MyD88. Para profundizar los conocimientos acerca del BV como vehículo de ADN en células inmunes, nos propusimos estudiar el rol de GP64 en la maduración de BMDCs.

Neutralización viral

Para estudiar si la maduración de las BMDCs por parte del BV es dependiente de GP64, se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra esta glicoproteína de superficie capaz de neutralizar la infección de este virión.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la neutralización del BV, se estudió el título infectivo de estos virus en células Sf9. Para ello, se pretrataron los viriones con los anticuerpos monoclonales anti-GP64 del clon AcV5 (no neutralizante) o AcV1 (neutralizante) por media hora. Se detectó una caída de dos órdenes de magnitud en el título

infectivo de los BVs neutralizados (Tabla R5). Por lo tanto, quedó demostrada la capacidad de AcV1 para neutralizar el virus.

Tratamiento	Título infectivo
BV sin tratamiento	3,2x10 ⁸ UFP/ml
BV tratado con AcV5	2,18x10 ⁸ UFP/ml
BV tratado con AcV1	1,49x10 ⁶ UFP/ml

Tabla R5: Títulos infectivos de BVs tratados con anticuerpos monoclonales. BVs de AcMNPV sin tratar, o tratados con diluciones 1:100 de los anticuerpos anti-GP64 clones AcV1 o AcV5 por 30 minutos a 37°C, fueron titulados en células Sf9-pXXLGFP (ver sección Materiales y Métodos).

Para evaluar el efecto de la neutralización de GP64 sobre la maduración de las BMDCs en cuanto a expresión de marcadores fenotípicos y citoquinas pro-inflamatorias y generación de actividad antiviral, estas células fueron tratadas con BVs previamente incubados con AcV1 o AcV5. La actividad antiviral en los sobrenadantes se evaluó mediante el ensayo con VSV y la presencia de IL-6 por ELISA. Los BVs neutralizados no indujeron actividad antiviral contra VSV (Tabla R6) ni tampoco la producción de IL-6 (Figura R14). Sin embargo, al estudiar la maduración fenotípica de las BMDCs, se detectó que la neutralización no alteró el incremento en la expresión de marcadores de maduración fenotípica CD86 y MHCII.

Tratamiento	Actividad antiviral (IC ₅₀)
Mock	< 4
BV	35,9
BV + AcV5	32
BV + AcV1	< 4

Tabla R6: Actividad antiviral en BMDCs con BVs neutralizados. BMDCs fueron tratadas con *mock*, BVs o BVs tratados con 1:100 de los anticuerpos anti-GP64 clones AcV1 o AcV5, por 30 min a 37°C. Luego de 16 h se cosechó el sobrenadante y se evaluó la actividad antiviral contra VSV en células MDBK.

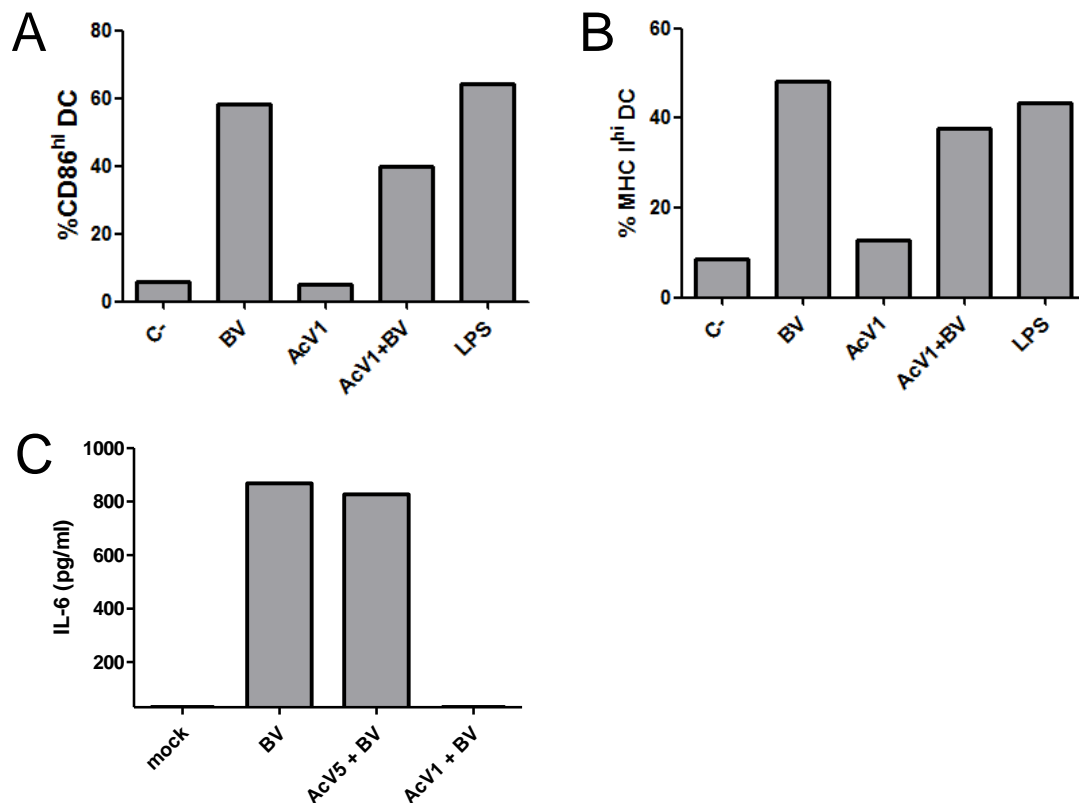


Figura R14. Maduración de BMDCs tratadas con BVs neutralizados. BMDCs fueron tratadas con mock, BVs o BVs tratados con 1:100 de los anticuerpos anti-GP64 clones AcV1 o AcV5, por 30 minutos a 37°C. 16 h después se cosecharon las células y los sobrenadantes. Las células se marcaron para analizar por citometría de flujo el aumento del porcentaje de células CD11c⁺ CD86^{high} y MHC II^{high} (A, B). Se evaluó la presencia de IL-6 en los sobrenadantes por ELISA (C).

Los resultados muestran que la neutralización de GP64 impide que los BV induzcan la producción de citoquinas e IFNs. Sin embargo, también indican que hay activación de alguna vía de señalización, ya que se desencadena el incremento en la expresión de marcadores fenotípicos de maduración.

Efecto de la pérdida de funcionalidad de GP64

Con el objetivo de estudiar el efecto de la pérdida de funcionalidad de GP64 en la activación de BMDCs por el BV, se realizó sobre viriones brotados un shock de pH (pH 4,5) que simula las condiciones endosomales (ver sección Materiales y Métodos). Esto ocasiona un cambio en la conformación de la estructura de GP64 de pre fusión a una estructura de post

fusión, un proceso que es parcialmente reversible estructuralmente pero completamente irreversible en cuanto a la funcionalidad de la proteína [151].

Para analizar la eficiencia del tratamiento, se evaluó la disminución en el título infectivo del BV. El shock de pH produjo una baja de dos órdenes de magnitud en el título viral en células de insecto (Tabla R7), indicando que GP64 perdió su actividad fusogénica en la mayor parte de las partículas virales.

Tratamiento	Título en células de insecto
BV tratado con PBS	$1,1 \times 10^8$ UFP/ml
BV acidificado	$1,49 \times 10^6$ UFP/ml

Tabla R7: Título infectivo de BVs tratados con shock de pH. BVs de AcMNPV fueron tratados con PBS pH = 6,2, o llevados a pH = 4,5 (acidificadas) por 30 minutos, al término de los cuales fue restituido el pH = 6,2. La titulación se realizó en células Sf9-pXXLGFP (ver sección Materiales y Métodos).

Con el fin de estudiar los efectos de la pérdida de funcionalidad de GP64 en la maduración de BMDCs por BVs, las células fueron tratadas con estos virus. La acidificación impidió que los BVs induzcan actividad antiviral contra VSV en el sobrenadante del cultivo celular (Tabla R8). Este tratamiento también abolió la capacidad de inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento en la expresión de los marcadores de maduración fenotípica CD86 y MHCII (Figura R15). Esto demuestra que la funcionalidad de GP64 es necesaria para que el BV induzca la maduración de BMDCs.

Tratamiento	Actividad antiviral (IC ₅₀)
mock	< 4
BV	35,9
Mock acidificado	< 4
BV acidificado	< 4

Tabla R8: Actividad antiviral en BMDCs tratadas con BVs acidificados. BMDCs fueron tratadas con mock, BVs o BVs tratados a pH 4,5 por 30 min. 16 h después se cosechó el sobrenadante y se evaluó la actividad antiviral contra VSV en células MDBK.

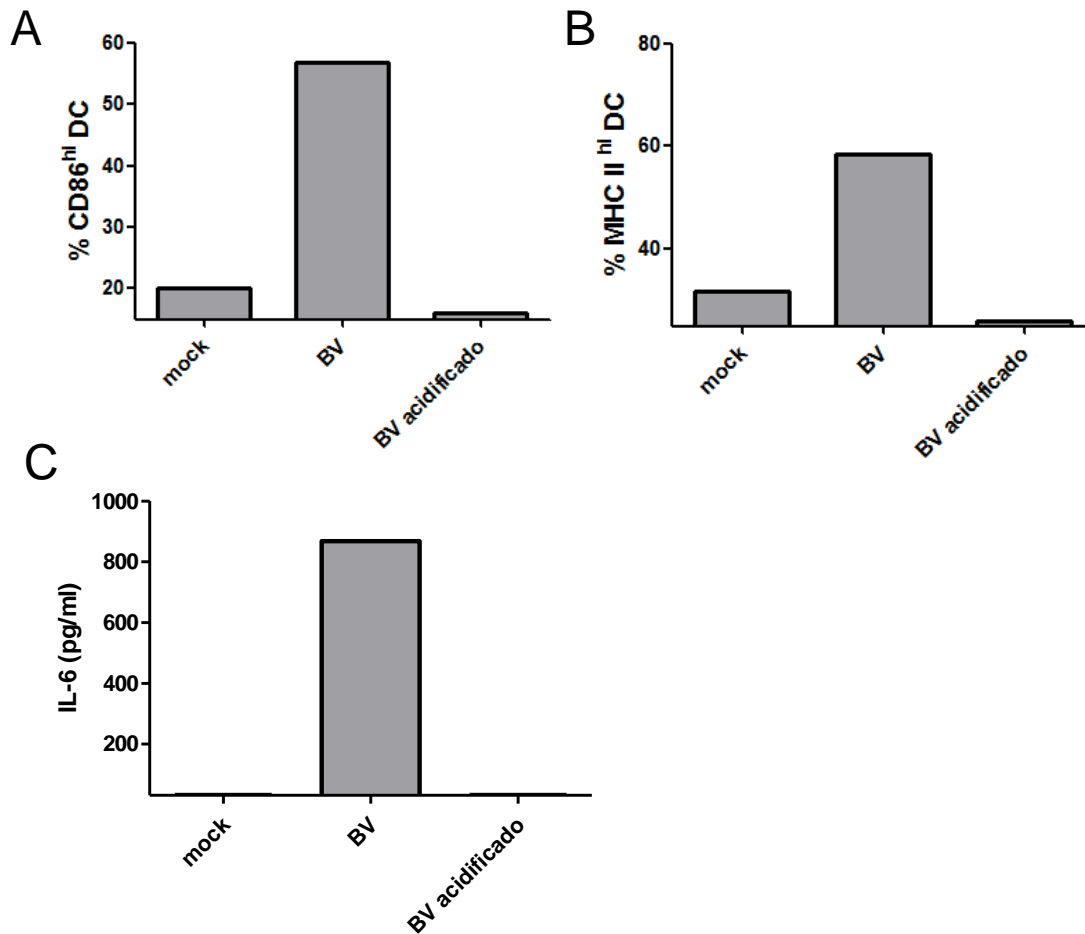


Figura R15. Maduración de BMDCs tratadas con BVs acidificados. BMDCs fueron tratadas con mock, BVs o BVs tratados a pH 4,5 por 30 min. 16 h después se cosecharon las células y se marcaron para analizar por citometría de flujo el aumento del porcentaje de células CD11c⁺ CD86^{hi} y MHCII^{hi} (A, B). Se estudió la presencia de IL-6 en los sobrenadantes del cultivo celular por ELISA (C).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican, en su conjunto, que los baculovirus sin GP64 tales como los ODVs pueden entrar en BMDCs, pero también sugieren que la presencia y funcionalidad de esta glicoproteína es necesaria para alcanzar ciertos destinos e impactar en las vías de activación de la respuesta inmune innata.

Búsqueda de un receptor candidato para GP64 en BMDCs

Se reportó que la proteína OVA, con la cual colocaliza el BV pero no el ODV, ingresa en BMDCs por endocitosis mediada por el receptor de manosa (MR), un CLR presente en la superficie de macrófagos y DCs [152]. Por otro lado, nuestros resultados muestran que GP64 es fundamental para el impacto de los BVs en células inmunes. Esta glicoproteína tiene residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina, por lo que podría ser agonista del MR, así como de otros receptores de la familia de los CLR.

Recientemente se reportaron dos lectinas tipo C de *Musca domestica* (MdCTL1 y MdCTL2) que tienen la capacidad de neutralizar BVs de AcMNPV e inhibir su capacidad de infectar células de insectos [153]. Con el fin de hallar si existe algún CLR emparentado evolutivamente con los MdCTL en mamíferos que pudiera interactuar con el BV de AcMNPV, se decidió analizar por BLAST la existencia de proteínas homólogas en ratón (*Mus musculus*) para estos componentes de la respuesta inmune innata de invertebrados. El análisis se realizó teniendo en cuenta únicamente el dominio de lectina tipo C de estas proteínas. La búsqueda arrojó que la proteína con mayor probabilidad de estar relacionada con MdCTL1 es el MR, con un E-valor de 1×10^{-13} y una identidad de secuencia del 34,23% para el 100% del dominio analizado (Figura R16), aunque también se obtuvieron otros CLR murinos con E-valor bajo (ver Figura A3 en sección Anexo). Esto sugiere que el MR y otros CLR de ratones podrían ser capaces de interactuar con el BV en células de mamíferos y, por lo tanto, tener algún rol en la entrada de estos viriones. Por otro lado, no se detectaron proteínas de ratón con homología de secuencia con MdCTL2 (resultados no mostrados).

PREDICTED: C-type mannose receptor 2 isoform X1 [Mus musculus]

Sequence ID: [XP_006532469.1](#) Length: 1513 Number of Matches: 1

Range 1: 434 to 539

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
58.9 bits(141)	1e-13	Compositional matrix adjust.	38/111(34%)	59/111(53%)	6/111(5%)
Query 44	KYNWFQARNECLQKNMTLIAIDSAEKSALLTSLKRVFEKPHNLWIGGDDLQGDVFEVWS				103
	K +W +++ CL+ L++I S + +T +K+ E+ LWIG +DL Q F WS				
Sbjct 434	KRSWQESKRACLRGGGDLLSIHSMAELEFTKQIKQVEE---LWIGLNDLKLQMFVWS				490
Query 104	STGKRFEFTNWSKGNPSH-NHQEHCNVNLWEHSDFEWINDAPCNESKGFICE				153
	G FT+W P++ E CV +W + WND+PCN+S IC+				
Sbjct 491	D-GSLVSFTHWHPFEPNNFRDLSLEDCVTIW-GPEGRWINDSPCNQSLPSICK				539

Figura R16. Alineamiento aminoácido de MdCTL1 con el MR. Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia de la proteína MdCTL1 de *Musca domestica* en la base de datos correspondiente a la

especie *Mus musculus* mediante BLAST (NCBI). Se muestra el alineamiento con la secuencia de mayor E-valor obtenida (la secuencia del MR).

En base a los resultados *in silico*, se decidió evaluar si el MR está involucrado en la entrada de los BVs de AcMNPV en BMDCs. Con este fin, se trataron estas células con manano, un agonista de éste y otros CLR como DC-sign, antes del agregado de BVs de Ac-GFP. Se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de BMDCs GFP⁺ y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de GFP en las células (Figura R17). El análisis mostró que a mayores concentraciones de manano utilizadas, el porcentaje de células positivas para GFP tendió a decrecer y la IFM también tendió a ser menor, sugiriendo que podría estar ingresando menor cantidad de virus a las BMDCs tratadas con manano.

En conjunto, estos resultados sugieren que CLR como el MR podrían estar involucrados en la entrada del BV de AcMNPV en DCs.

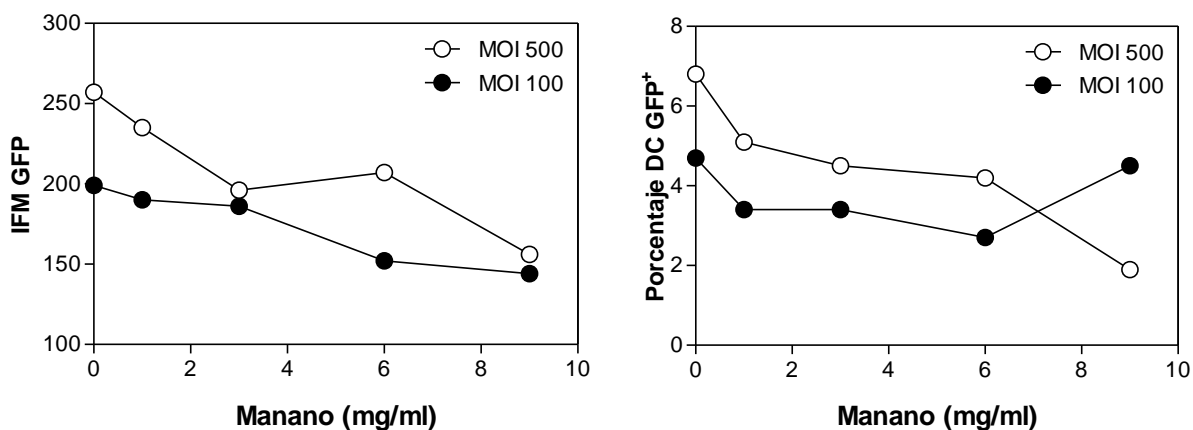


Figura R17. Bloqueo con manano de la entrada del BV de Ac-GFP en BMDCs. BMDCs fueron tratadas con distintas concentraciones de manano 30 min antes del agregado de BVs de Ac-GFP a distintas moi. Luego de incubar 1 h a 37 °C, se analizó la fluorescencia de GFP por citometría de flujo. Se muestran los gráficos de intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y de porcentaje de DCs GFP⁺ (B) en función de la concentración de manano.

Estudio del impacto de los BVs en células porcinas

En la primera parte de esta tesis se demostró la importancia de los IFNs para que el baculovirus logre inducir protección efectiva en ratones contra FMDV. Las DCs son la mayor

fuentes de IFN de tipo I, mientras que las células NK son las mayores productoras de IFN de tipo II entre las células de la inmunidad innata. Estudiar el impacto de los BV en estos tipos celulares en cerdos es un primer paso para comprender la factibilidad de emplear este virus como herramienta biotecnológica para inducir un estado antiviral a tiempos cortos en esta especie.

Estudio de la producción de interferones en CMSPs

Las CMSPs porcinas incluyen tanto cDCs, pDCs, y células NK, además de monocitos y otras células inmunes. El primer objetivo fue evaluar el efecto del BV en las CMSPs en cuanto a producción de mediadores inductores de estado antiviral y, más específicamente, IFN- α que es el principal mediador producido en respuesta a BVs en células inmunes murinas. Las CMSPs fueron purificadas a partir de muestras de sangre de cerdos de nueve semanas de edad y tratadas con BVs a diferentes multiplicidades de infección. Los sobrenadantes de estas células mostraron altos niveles de actividad antiviral contra VSV y la producción de mediadores antivirales mostró ser dependiente de la cantidad de BVs (Figura R18 A). Estos resultados demuestran que los BV inducen la producción de IFNs en células porcinas.

Con el objetivo de evaluar si la actividad antiviral inducida en CMSPs es mediada por IFN- α , se incubaron los sobrenadantes con un anticuerpo neutralizante anti-IFN- α (clon K9) y se evaluó la protección contra VSV. La actividad antiviral detectada fue significativamente menor con respecto a muestras tratadas con suero normal murino como control, lo cual indica que el IFN- α es responsable de al menos parte de la protección (Figura R18 B). Adicionalmente, se cuantificó IFN- α en estos sobrenadantes mediante el ELISA descrito anteriormente, confirmando que los BVs inducen fuertemente la producción de IFNs de tipo I con dependencia de la cantidad de virus (Figura R18 C).

Estos resultados muestran que es posible inducir actividad antiviral en células inmunes porcinas, y que esta respuesta es mediada por IFN- α , aunque también puede haber otros mediadores antivirales involucrados.

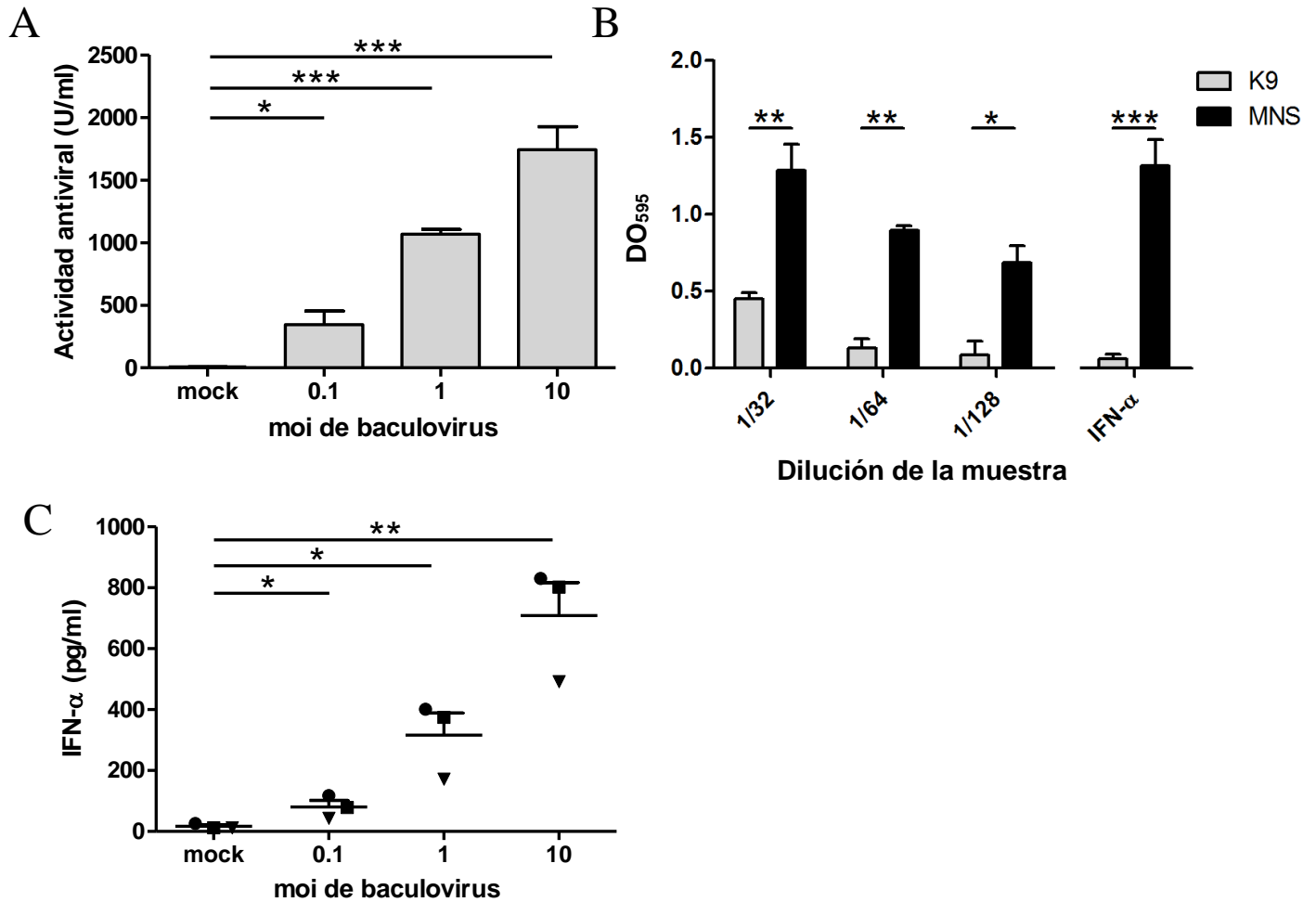


Figura R18. Estudio de la inducción de interferones por BVs en CMSPs porcinas. CMSPs de tres cerdos fueron tratadas con mock o con BVs por 16 hs y se colectaron los sobrenadantes. La actividad antiviral contra VSV de los sobrenadantes fue ensayada en células MDBK (4.62×10^8 U/mg IFN- α) (A). Se realizó un ensayo de neutralización de IFN- α en los sobrenadantes de CMSPs tratadas con BVs o en IFN- α porcino estándar tratando las muestras con anticuerpo neutralizante anti-IFN- α (clon K9) o con suero normal murino (SNM) por 1 h a temperatura ambiente. Se evaluó la actividad antiviral contra VSV en un bioensayo en células MDBK. Se midió la densidad óptica del cristal violeta a 595 nm (B). Se cuantificaron los niveles de IFN- α en los sobrenadantes por ELISA. ● Cerdo 1; ■ Cerdo 2; ▼ Cerdo 3 (C). Los gráficos representan al menos dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Estudio de las células productoras de IFN- α en CMSPs

Las pDCs son las mayores productoras de IFN- α , y dentro de las CMSPs porcinas también son conocidas con el nombre de células naturalmente productoras de IFN. Se caracterizan por expresar bajos niveles de SWC3 y altos niveles de CD4, marcadores mediante los cuales es estudiada la respuesta de células porcinas a inmunomoduladores.

Para evaluar las células productoras de IFN- α en respuesta a AcMNPV dentro de las CMSPs, se estimularon estas células con BVs y se determinó la producción de IFN- α en tres poblaciones celulares distintas por marcación de superficie con anticuerpo anti-SWC3 (CD172a), marcación intracitoplasmática con anticuerpo anti-IFN- α y citometría de flujo (Figura R19 A). Este análisis permitió la distinción entre CMSPs SWC3⁻, correspondientes a células de origen linfoide, las SWC3^{low}, entre las que se destacan las pDCs, y las SWC3^{high}, que incluyen monocitos y algunas cDCs entre otras células. El tratamiento con BVs condujo a que 7,4% de las células SWC3^{low} exprese IFN- α (Figura R19 B). El aumento en la expresión de IFN- α también se ve reflejado en un incremento de la fluorescencia correspondiente a esta citoquina en la población SWC3^{low} (Figura R19 C). Por otro lado, los BVs indujeron un leve aumento en los porcentajes de células productoras de IFN- α en las CMSPs SWC3⁻ y CMSPs SWC3^{high}. Estos resultados sugieren que las pDCs son activadas y producen IFN- α al ser estimuladas con BV.

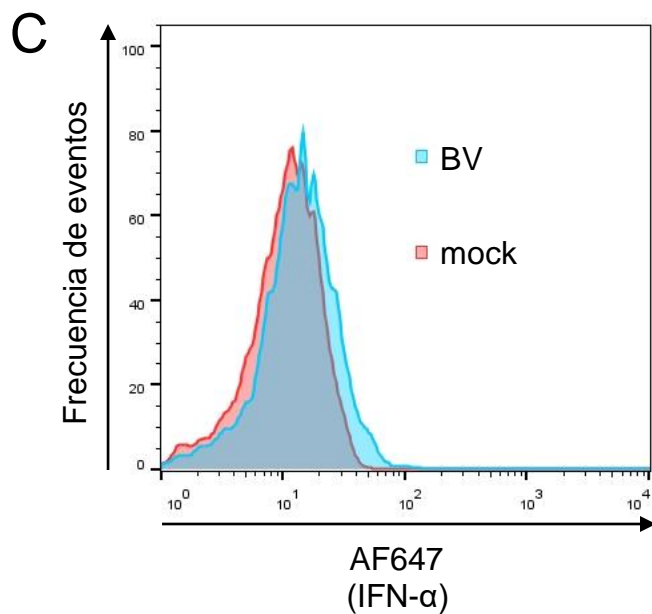
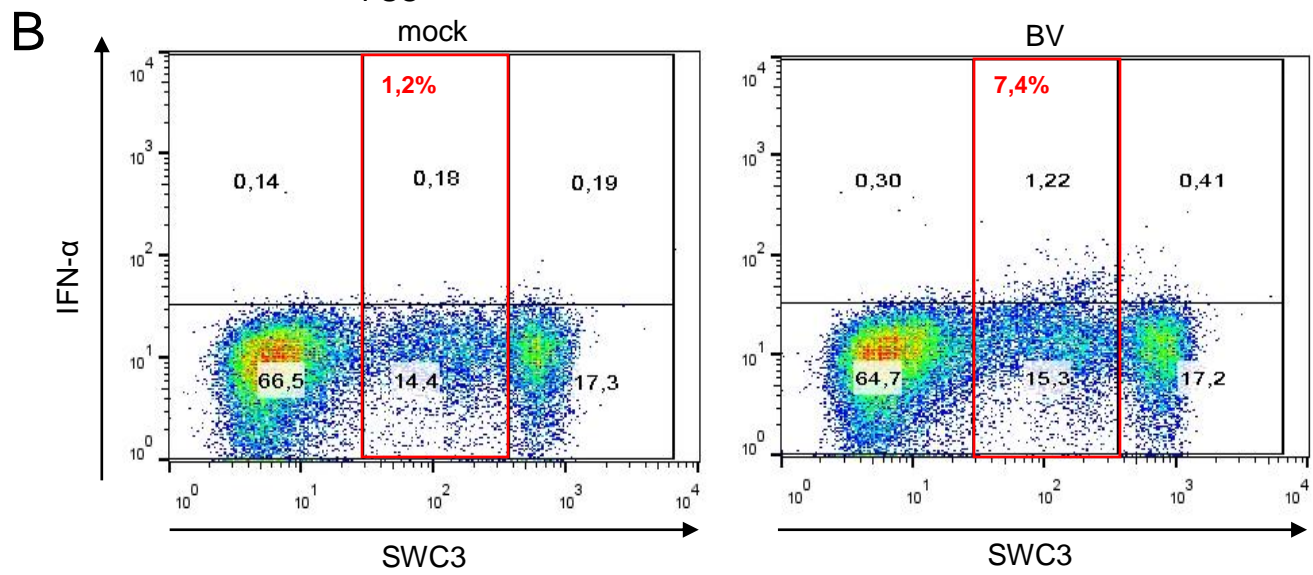
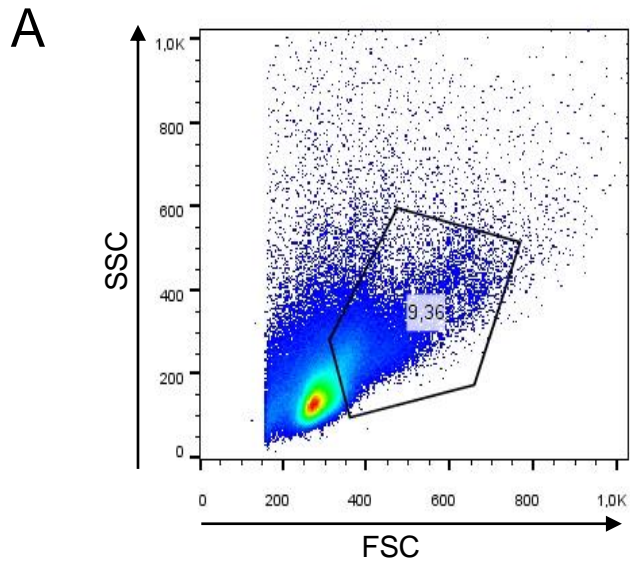


Figura R19 Expresión de IFN- α en células SWC3^{low}. CMSPs de origen porcino fueron tratadas con BVs (moi = 10) o con mock por 1:30 h. Se estudió la expresión de IFN- α en células SWC3^{low} y SWC3^{high} mediante la marcación de superficie de CD172a (SWC3) y marcación intracitoplasmática de IFN- α . Las células se analizaron por citometría de flujo como se muestra en la figura (A). Se estudió el porcentaje de células productoras de IFN- α (B). Se graficó como histograma la intensidad de fluorescencia de Alexa fluor 647 (anticuerpo anti-IFN- α) de las células SWC3^{low} (C).

Estudio de las células productoras de IFN- γ en CMSPs

Como pudo demostrarse anteriormente, las células NK resultaron ser relevantes para lograr una óptima efectividad en la protección otorgada por BV en el modelo de ratones contra un desafío letal con FMDV. Dichas células, además de caracterizarse por su actividad citotóxica contra células infectadas, son las principales productoras de IFN- γ a tiempos cortos. Por lo tanto, se estudió si las células NK porcinas también son productoras de IFN- γ en el contexto de la estimulación por BV.

Para realizar este estudio, CMSPs fueron estimuladas con BVs y se determinó la producción de IFN- γ en linfocitos CD3⁻ por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo (Figura R20). Como puede observarse, 5,2% de los linfocitos CD3⁻ resultaron ser productores de IFN- γ bajo el estímulo con BVs. Los resultados demostraron que las células NK porcinas produjeron altos niveles de esta citoquina.

De esta manera, se demostró que los BVs de AcMNPV, además de inducir la producción de IFNs de tipo I, inducen la producción de IFNs de tipo II por células NK en CMSPs porcinas, indicando que es posible activar el sistema inmune innato mediante el uso de baculovirus en esta especie.

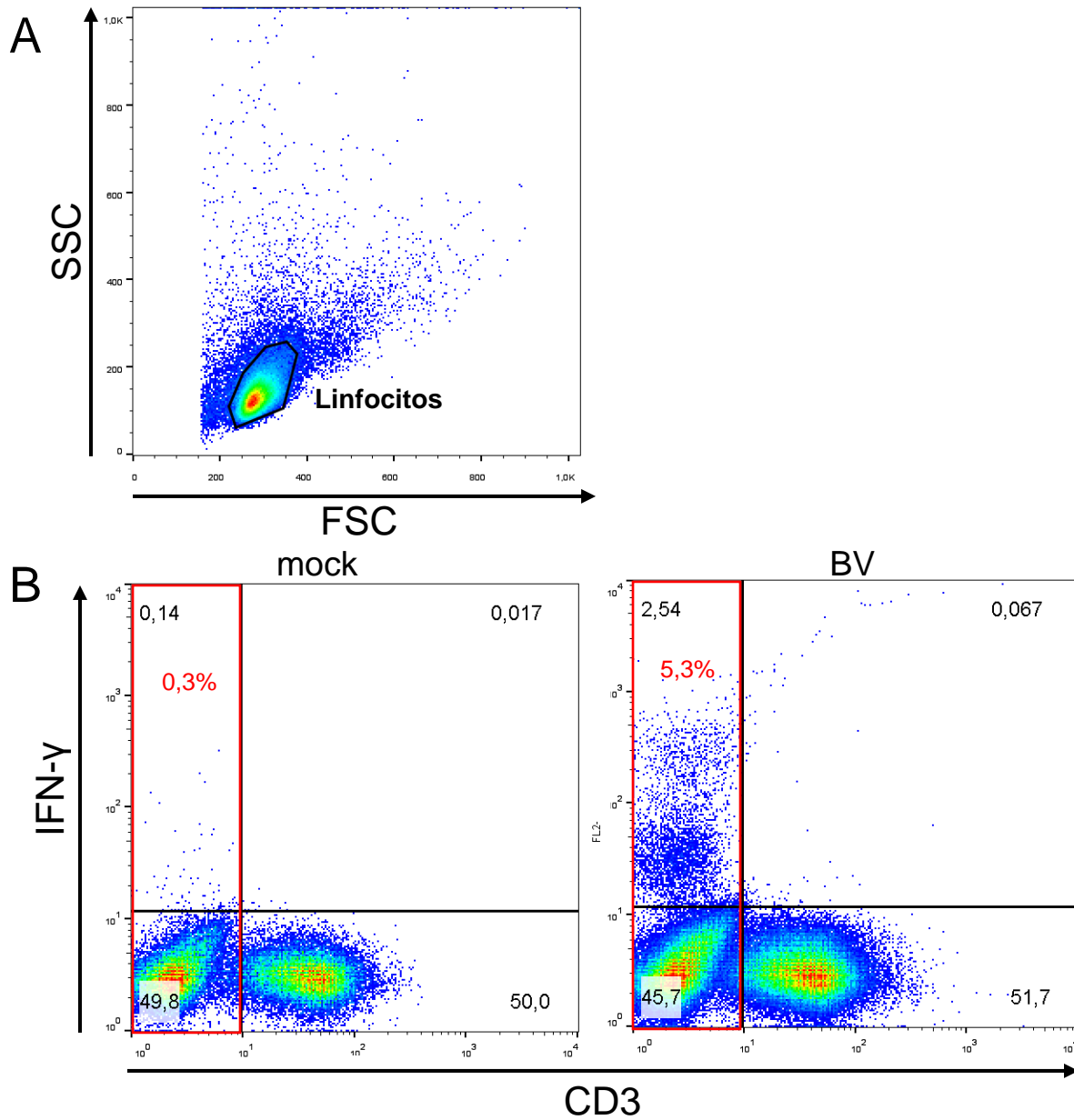
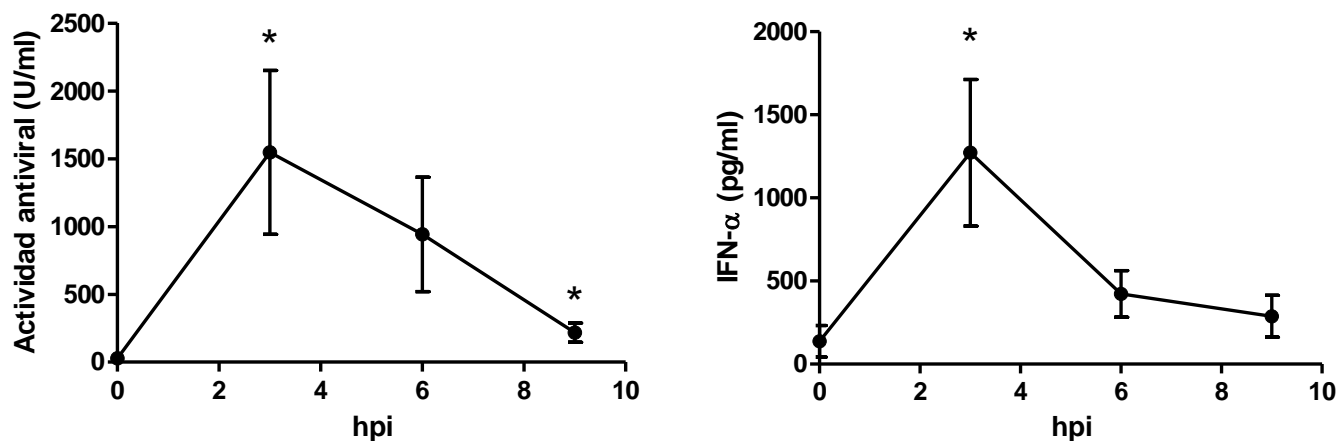


Figura R20 Expresión de IFN- γ en linfocitos CD3⁺. CMSPs de origen porcino fueron tratadas con BVs (moi = 10) o con mock por 1:30 h. Se estudió la expresión de IFN- γ en las células NK mediante la marcación de superficie de CD3 y marcación intracitoplasmática de IFN- γ . Las células se analizaron por citometría de flujo como se muestra en la figura (A). Se estudió el porcentaje de células CD3⁺ productoras de IFN- γ (B).

Evaluación del impacto de los BVs de AcMNPV en cerdos

Evaluación de la producción de IFNs en cerdos inoculados con BVs

A partir de los resultados obtenidos en células de origen porcino, se decidió evaluar la capacidad de los BVs para inducir actividad antiviral en cerdos *in vivo*. Cinco cerdos de nueve semanas de edad fueron inoculados con 1×10^9 UFPs de BVs por vía i.v. Se tomaron muestras de suero inmediatamente antes de la inmunización y a distintos tiempos post inoculación y se evaluó la actividad antiviral contra VSV y los niveles de IFN- α por ELISA (Figura R21). Se detectó una actividad anti-VSV promedio de 1547 U/ml y 1272 pg/ml de IFN- α en los sueros de los animales a las 3 horas post inmunización. La actividad antiviral correlacionó temporalmente con la producción de IFN- α en el suero de los animales, que



alcanzaron picos de inducción durante las primeras 6 horas post inmunización.

Figura R21. Curva temporal de producción de interferones en suero de cerdos inoculados con BV. Cinco cerdos fueron inmunizados con 1×10^9 UFP de BV AcMNPV y se tomaron muestras de suero inmediatamente antes y 3, 6 y 9 horas post-inoculación. La actividad antiviral contra VSV en sueros fue evaluada en células MDBK (4.62×10^8 U/mg IFN- α) (A). Los niveles de IFN- α fueron cuantificados por ELISA (B). Las diferencias estadísticamente significativas entre sueros tomados pre y post inoculación se identificaron por medio de una prueba t de student. *, $p < 0.05$.

De esta manera quedó demostrada la capacidad del BV para inducir la producción de mediadores antivirales como IFN- α *in vivo* en cerdos, promoviendo la generación de actividad antiviral en el animal.

Evaluación de la actividad antiviral contra FMDV en suero de cerdos inoculados con BVs

Los sueros de cerdos inmunizados con BVs fueron utilizados para evaluar si los IFNs inducidos permiten proteger células no inmunes en un desafío *in vitro* con FMDV, mediante el ensayo antiviral previamente descrito. Los resultados mostraron que los baculovirus indujeron altos niveles de actividad antiviral (5827 U/ml) y que la protección contra FMDV también correlacionó temporalmente con la producción de IFN- α y la actividad antiviral contra VSV (figura R22).

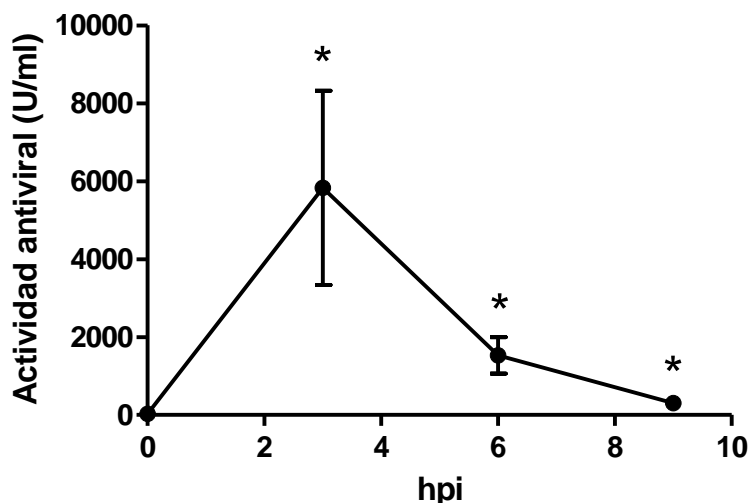


Figura R22. Curva temporal de actividad antiviral contra FMDV en suero de cerdos inoculados con BV. Cinco cerdos fueron inmunizados con 1×10^9 UFP de BV AcMNPV y se tomaron muestras de suero inmediatamente antes y 3, 6 y 9 horas post-inoculación. La actividad antiviral contra FMDV O1Campos en sueros fue evaluada en células LFBK (4.62×10^8 U/mg IFN- α). Las diferencias estadísticamente significativas entre sueros tomados pre y post inoculación se identificaron por medio de una prueba t de student. *, $p < 0.05$.

Estos resultados en su conjunto indican que los BVs de AcMNPV impactan en el sistema inmune innato en cerdos *in vivo*, generando la producción de IFNs y por lo tanto

actividad antiviral, logrando la protección de células porcinas contra una infección de FMDV.

Generación de baculovirus recombinantes para la optimización de la inducción de actividad antiviral en cerdos

Para la optimización del impacto de los BVs en porcinos se realizaron dos abordajes biotecnológicos distintos basados en la importancia de la activación de vías dependientes de TLR9 y de sensores citosólicos de ADN. En primer lugar, teniendo en cuenta que los TLR9 de cada especie tienen distintos requerimientos en secuencia de motivos CpG [154], se desconocía inicialmente si los baculovirus tendrían en cerdos los mismos efectos que en ratones. Por lo tanto, se construyó un BV enriquecido en motivos CpG específicos para porcinos (Ac-pCpG) para evaluar si es posible aumentar de esta manera el impacto en esta especie (Figura R23). Por otro lado, está descrito que el pseudotipado con la glicoproteína G de VSV en los baculovirus aumenta la eficiencia de transducción en células de mamíferos. Es posible que su efecto en la entrada del BV incremente también el *delivery* de ADN al citoplasma y, por lo tanto, el impacto en sensores citosólicos de ADN. En base a esto, se diseñó otro BV pseudotipado con la proteína G de VSV (Ac-GVSV) (Figura R23). Ambos baculovirus recombinantes fueron construidos mediante la metodología Bac to Bac (Invitrogen).

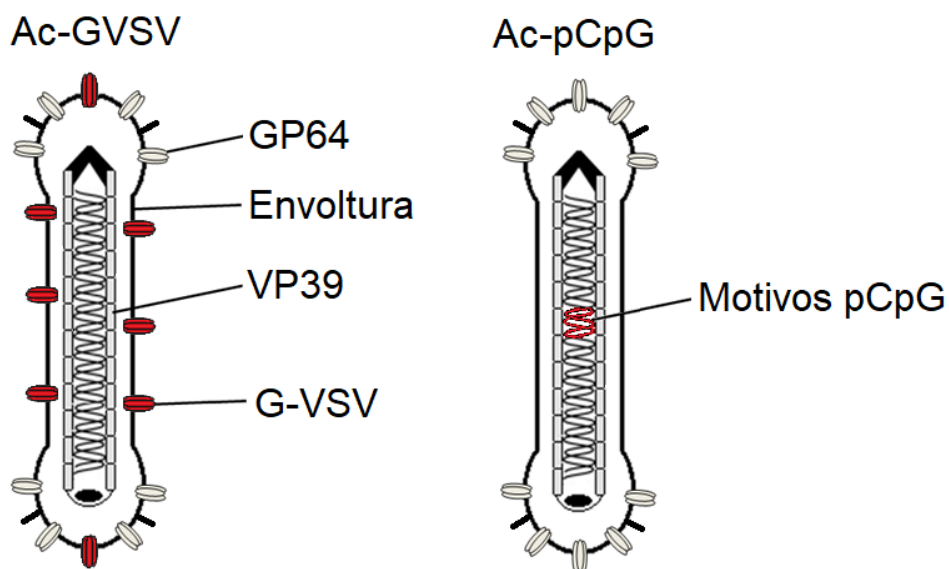


Figura R23: Esquemas de los baculovirus recombinantes. Representación esquemática de la estructura de los BVs de Ac-GVSV y Ac-pCpG. Las principales proteínas y estructuras están indicadas.

Construcción del plásmido de transferencia pFB-pCpG

Para la construcción del baculovirus recombinante Ac-pCpG se seleccionaron motivos CpG a partir de oligodesoxinucleótidos (ODNs) que demostraron previamente tener efectos en el sistema inmune porcino (Tabla R10).

ODN	Secuencia
2216	GGG GGA CGA TCG TCGGGGGG
D19	GGT GCA TCG ATG CAGGGGGG
H1a	GGTATTTCGAAATAGGGGGG
ODN 3	GCT AGA CGT TAG CGT

Tabla R9: Secuencias de ODNs seleccionadas para enriquecer el genoma baculoviral en motivos CpG específicos para cerdos. Cuatro ODNs fueron seleccionados a partir de trabajos en los que se demostraron sus efectos inductores en células de origen porcino. Las secuencias nucleotídicas se muestran en la tabla.

Se combinaron los 4 motivos CpG en una secuencia de 75 pb:

GGGGGACGATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTATTTTC
GAAATAGGGGGGGCTAGACGTTAGCGT

Esta secuencia, repetida 6 veces en tándem fue sintetizada en una construcción llamada pCpG, que fue clonada en pFB, dando lugar a pFB-pCpG, y se confirmó la inserción del fragmento por digestión con enzimas de restricción.

Construcción del plásmido de transferencia pFB-GVSV

Para obtener la secuencia codificante de GVSV, se partió del plásmido comercial pCMV-VSV-G. Se realizó una digestión con EcoRI obteniendo una secuencia de 1636 pb que fue detectada por electroforesis en gel de agarosa y purificada. La secuencia de GVSV se clonó río abajo del promotor de poliedrina en el vector pFB digerido de la misma manera, obteniéndose así el vector recombinante pFB-GVSV. Se confirmó la inserción y la orientación del fragmento en el vector de transferencia mediante digestión con enzimas de restricción.

Obtención de los bécmidos recombinantes

Los baculovirus recombinantes se obtienen en base a la transposición sitio específica del *cassette* de interés desde el plásmido dador pFB a un bécrido que contiene el genoma de AcMNPV en la cepa de *E. coli* DH10B. Una recombinasa codificada por el plásmido T, contenido en *E. coli* DH10B, media la transposición al reconocer sitios específicos en medio del gen de lac Z ubicado en el *locus* poliedrina. Se utilizaron los plásmidos de transferencia recombinantes pFB-GVSV y pFB-pCpG para transformar bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH10B. La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido se realizó en placas con LB agar con los antibióticos kanamicina (resistencia otorgada por pFB), tetraciclina (resistencia otorgada por pHelper) y gentamicina (resistencia otorgada por el bécrido), mientras que el evento de transposición se seleccionó por el color de la colonia (fenotipo blanco por interrupción del gen lac Z) en presencia de IPTG y Bluo-gal. La posterior confirmación de la presencia del *cassette* de interés en el bécrido recombinante extraído de un cultivo bacteriano se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos

comerciales M13 sentido y antisentido, cuyas secuencias son complementarias a regiones pertenecientes al b́acmido, permitiendo amplificar el sitio de transposici3n, obteniéndose un fragmento de 500 pb o 2200 pb ḿas el tama ́o del inserto, seg ́n ocurriera o no transposici3n.

Obtenci3n de los baculovirus recombinantes

Se realizaron transfecciones de c3lulas de insecto Sf9 mediadas por l3pidos cati3nicos con los b́acmidos recombinantes y se obtuvieron los baculovirus del fenotipo brotado Ac-pCpG y Ac-GVSV en los sobrenadantes de transfecci3n. Posteriormente, los BV recombinantes fueron amplificados mediante dos pasajes por c3lulas Sf9 y los sobrenadantes del segundo pasaje constituyeron los *stocks* virales que fueron titulados y conservados a 4 °C hasta su uso.

Los t3tulos de Ac-pCpG y Ac-GVSV fueron cercanos a los del AcMNPV wt, indicando que la inserci3n de secuencias foráneas y la expresi3n de GVSV no afectaron la replicaci3n del viral (Tabla R12).

	AcMNPV wt	Ac-pCpG	Ac-GVSV
T3tulo infectivo (UFP/ml)	$3,37 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^7$	$2,69 \times 10^8 \pm 5,1 \times 10^7$	$2,44 \times 10^8 \pm 2,55 \times 10^7$

Tabla R10. T3tulos infectivos de los *stocks* de BVs recombinantes y wt. Los *stocks* de AcMNPV wt, Ac-pCpG y Ac-GVSV utilizados en los experimentos fueron titulados en c3lulas Sf9-pXXLGFP simultáneamente y en dos experimentos independientes. En la tabla se expresan los valores medios obtenidos y su error est́andar.

Expresi3n de la glicoprote3na G de VSV

Para comprobar que Ac-GVSV expresa la prote3na G de VSV, se infectaron c3lulas Sf9 con el stock viral a una moi de 5 y como control se infectaron c3lulas Sf9 con BVs de AcMNPV wt. A los 5 d3as post infecci3n, se detect3 la presencia de la glicoprote3na tanto en extractos de c3lulas Sf9 en las que se amplific3 el virus, como en la part3cula viral luego de ser purificada por colch3n de sacarosa (Figura R29 A). Adeḿas, se pudo confirmar que la glicoprote3na es funcional al observar por microscop3a 3ptica una gran cantidad de sincicios en los cultivos de c3lulas Sf9 infectadas con Ac-GVSV (Sf9-GVSV) (Figura R29 B), efecto esperado para esta prote3na en el medio Grace's (pH 6,2).

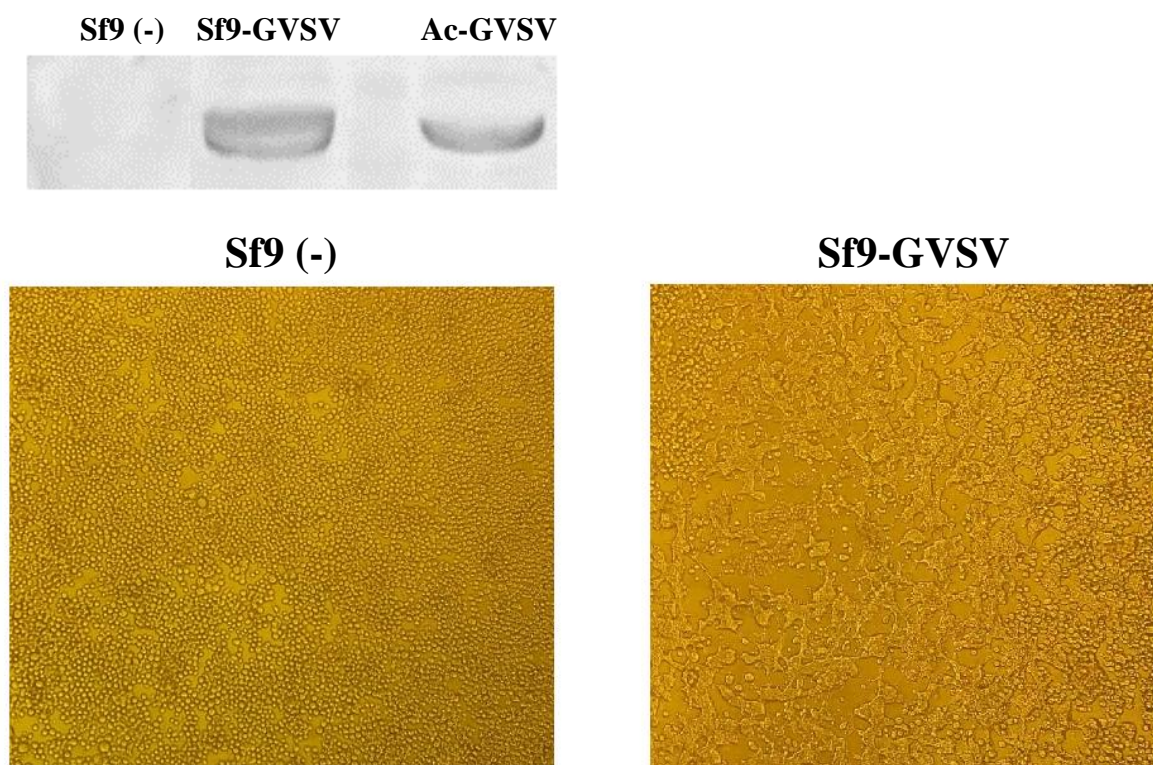


Figura R24. Estudio de la expresión de G-VSV en Sf9-GVSV y Ac-GVSV. Western blot de muestras de Ac-GVSV concentradas y purificadas por colchón de sacarosa y células Sf9 infectadas con Ac-GVSV o AcMNPV (-) revelado con anticuerpo anti-GVSV para evidenciar la presencia de la glicoproteína (A). Células Sf9 fueron infectadas con AcMNPV (-) o con Ac-GVSV e incubadas a 27°C y pH 6,2 durante 7 días y observadas por microscopía óptica (B).

Estudio de la inducción de IFNs por Ac-pCpG

La evaluación del efecto en el enriquecimiento en motivos CpG específicos para el TLR9 porcino se realizó en CMSPs purificadas a partir de sangre de cerdos. Estas células fueron tratadas con baculovirus de manera similar a los ensayos anteriores, con el fin de comparar AcMNPV wt y Ac-pCpG en cuanto a producción de IFNs en el sobrenadante, evaluando la generación de actividad antiviral contra VSV y la producción de IFN- α por ELISA. En la Figura R30 se muestra que no se detectaron diferencias significativas en la inducción de actividad antiviral contra VSV al tratar las células con uno u otro virus a distintas concentraciones. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a producción de IFN- α evaluado por ELISA.

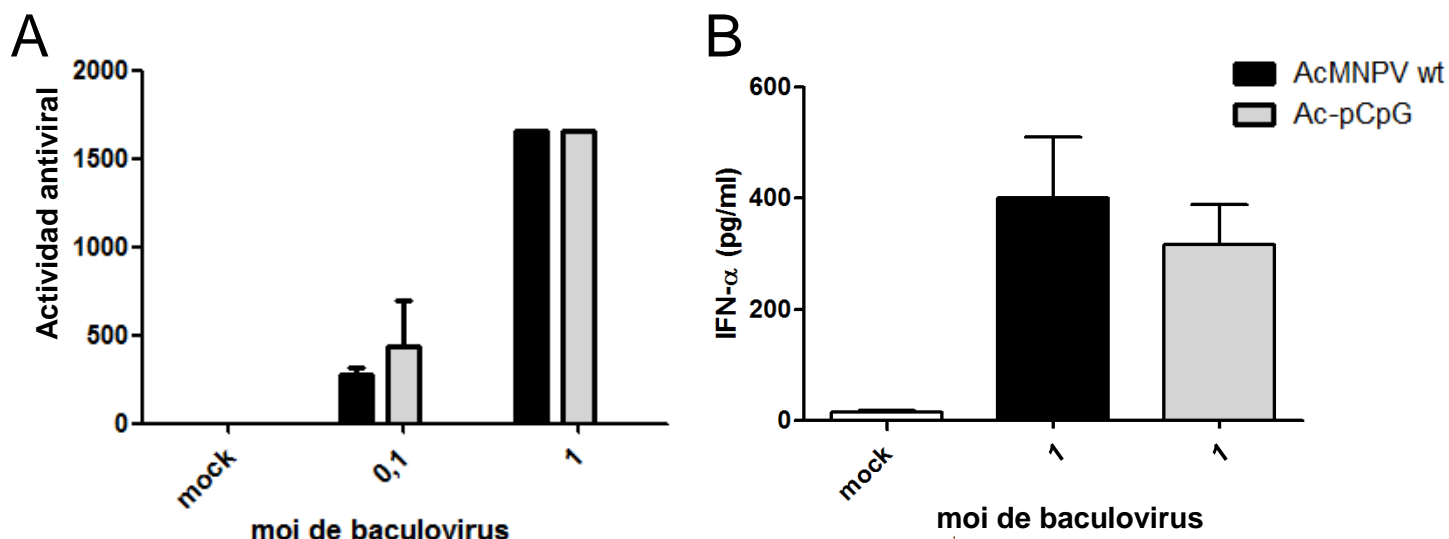


Figura R25. Comparación de los IFNs inducidos por AcMNPV wt y Ac-GVSV. CMSPs porcinas fueron tratadas con mock o con BVs de AcMNPV o Ac-pCpG por 16 hs y se colectaron los sobrenadantes. Los niveles de actividad antiviral contra VSV en las muestras se evaluaron en células MDBK ($4,62 \times 10^8$ U/mg IFN- α) (A). Se cuantificó IFN- α por ELISA (B). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student.

Estos resultados señalan que una mayor frecuencia de motivos CpG no genera diferencias en los niveles de IFN- α y actividad antiviral inducidos por los BVs en el sobrenadante de CMSPs porcinas en las condiciones evaluadas. Sin embargo, con los experimentos realizados no es posible descartar que tenga efecto en alguna población celular específica, como en pDCs.

Estudio de la inducción de IFNs por Ac-GVSV

Por otra parte, Ac-GVSV también fue utilizado para tratar CMSPs porcinas y evaluar en el sobrenadante la generación de actividad antiviral contra VSV y la producción de IFN- α por ELISA para comparar sus efectos con el AcMNPV wt. Los resultados obtenidos muestran que hay un aumento significativo en la inducción de IFN- α al tratar las células con Ac-GVSV, que también se ve reflejado como una tendencia al evaluar actividad antiviral contra VSV (Figura R26).

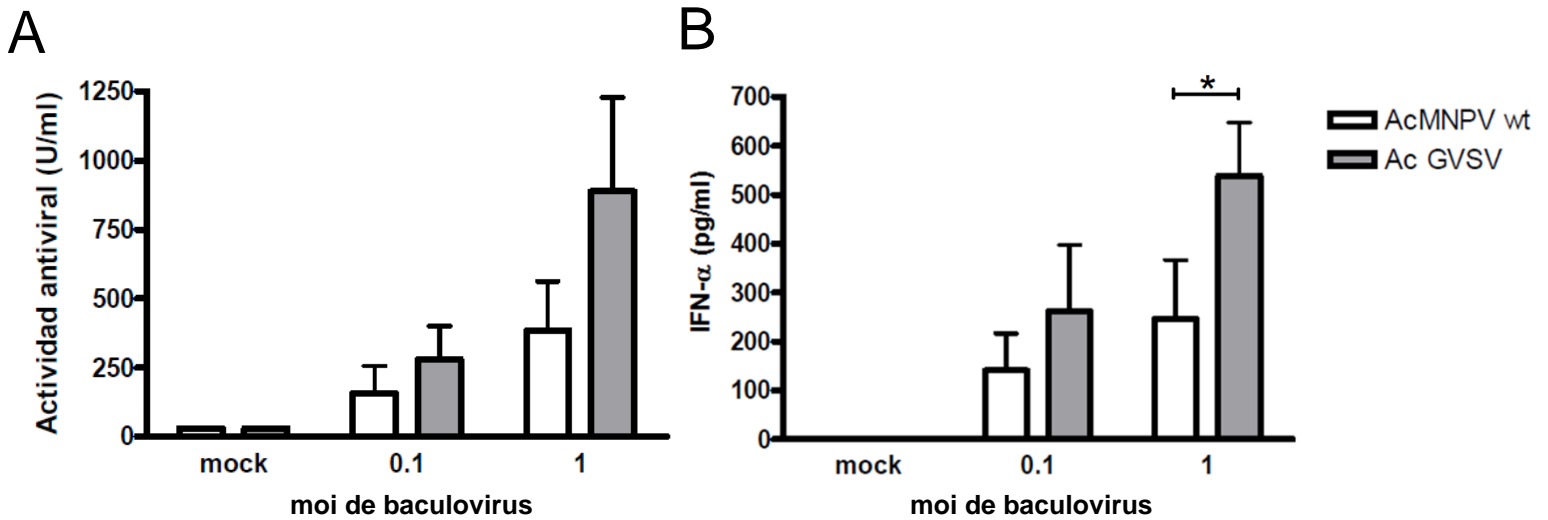


Figura R26. Comparación de los IFNs inducidos por AcMNPV wt y Ac-GVSV. CMSPs porcinas fueron tratadas con mock o con BVs de AcMNPV o Ac-GVSV por 16 hs y se colectaron los sobrenadantes. Los niveles de actividad antiviral contra VSV en las muestras se evaluaron en células MDBK ($4,62 \times 10^8$ U/mg IFN- α) (A). Se cuantificó IFN- α por ELISA (B). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student; *, $p < 0.05$.

Los resultados obtenidos indican que el impacto del baculovirus en la producción de IFN- α y, en consecuencia, en la inducción de actividad antiviral en porcinos pudo ser mejorado mediante el pseudotipado con la proteína G de VSV.

Discusión

A pesar de que llevaban décadas siendo estudiados como bioinsecticidas, los baculovirus fueron utilizados como vectores de expresión por primera vez en un trabajo publicado por Smith y colaboradores en diciembre de 1983, en el cual expresaron IFN- β humano en células de insecto. A partir de ese momento nació el BEVS y su uso se popularizó con los años, surgiendo así una enorme variedad de nuevas aplicaciones para los baculovirus. Este sistema ha sido uno de los más empleados para la expresión de proteínas y cápsides vacías (VLPs, del inglés *virus like particles*) con fines vacunales. Pero en 1985 Carbonell y colaboradores demostraron que los BVs de AcMNPV también podían transducir células de origen murino expresando un gen reportero bajo el control de un promotor adecuado.

En 1999 Gronowski y colaboradores demostraron por primera vez que los BVs de baculovirus inducen actividad antiviral contra VSV en células de mamíferos. Por medio de anticuerpos neutralizantes, vieron que esta respuesta dependía de IFN- β en fibroblastos de embrión murino (MEF, del inglés *murine embryo fibroblasts*), mientras que en esplenocitos de ratón la dependencia era de IFN- α . Además, la inmunización con BVs en ratones con dosis 20 y 1h antes de un desafío letal con EMCV protegió a un 80% de los animales, demostrando que también pueden dar respuestas sistémicas generando un estado antiviral. Estos virus habían sido utilizados para transducir más de 35 líneas celulares de mamíferos sin signos de replicación, por lo que constituyó en aquel momento una evidencia de que la inducción de IFNs en mamíferos no depende necesariamente de la replicación viral [90]. Por su parte, Abe y colaboradores demostraron que el BV es capaz de inducir la respuesta inmune innata en ratones por vías dependientes e independientes de TLR9. En este trabajo, mediante la inoculación de BVs de AcMNPV por vía intranasal, lograron proteger el 100% de los animales desafiados con virus influenza a las 24 h post inoculación [89]. Estos trabajos sentaron antecedentes acerca del efecto inmunoestimulador de los BVs de AcMNPV y arrojaron los primeros indicios acerca de los mecanismos involucrados en el establecimiento de un estado antiviral en ratones. Debido a que los baculovirus no están adaptados a la infección en mamíferos, no han desarrollado estrategias de evasión o inhibición del sistema inmune. Es así que activan una fuerte respuesta inmune innata con producción de citoquinas pro-inflamatorias e IFNs a las pocas horas de su inoculación.

Actualmente, luego de 20 años de investigaciones, se conoce con mayor profundidad la capacidad inmunoestimuladora de los BVs y los mecanismos implicados en el

establecimiento de la respuesta inmune. Niu y colaboradores demostraron que los baculovirus inducen la respuesta inmune innata en aves. En su trabajo, los BVs de *Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus* (ApNPV) establecieron un estado antiviral en pollos neonatos capaz de proteger el 80% de los animales contra un desafío letal con virus de la bronquitis infecciosa [91]. Por otra parte, Emran y colaboradores recientemente publicaron un trabajo en el que fueron más allá de las enfermedades virales y estudiaron si el estado protector inducido por baculovirus también es eficaz para otorgar protección contra el parásito protozoario *Plasmodium berghei*. Sus resultados muestran que una dosis de 1×10^8 UFPs de BVs por vía intra muscular (i.m.) protege al 100% de los ratones durante 7 días, expandiendo la potencialidad de su uso a otros tipos de patógenos. Incluso, el tratamiento con BVs 24 h después del desafío eliminó completamente los parásitos presentes en fase de hígado con mayor eficiencia que la droga comúnmente utilizada, primaquina [92].

En los últimos años se ha comprobado que los BVs inducen la maduración de DCs, con incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y altos niveles de citoquinas, así como la activación de las células NK de forma directa, a través del TLR9, y de forma indirecta, a través del contexto de citoquinas pro-inflamatorias [77, 95]. La activación de estas células, fundamentales en el establecimiento de respuestas frente a tumores, lleva a que los BVs promuevan una potente inmunidad antitumoral en ratones, demostrada en un modelo de metástasis de hígado. La inoculación de DCs tratadas con BVs también es capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral que mostró ser eficaz contra carcinoma pancreático humano, carcinoma de pulmón de Lewis y un modelo de melanoma murino [93-95]. En conjunto, estos trabajos ilustran la potencialidad del uso del BV de baculovirus como inmunopotenciador, promoviendo un estado protector contra tumores, infecciones virales e infecciones parasitarias, que debe ser estudiado en mayor profundidad.

Hervas-Stubbs, por su parte, demostró que estos virus también adyuvan respuestas humorales y de células T CD8⁺ contra antígenos coadministrados, y que los BVs contaminantes en VLPs producidas por BEVS tienen un rol central en su inmunogenicidad, observación confirmada por otros autores [78, 155]. A partir de estos trabajos, los BVs también comenzaron a emplearse en el desarrollo de vacunas vectorizadas de nueva generación, con diversas estrategias que van desde la expresión *de novo* de antígenos *in vivo*, hasta el *display* de antígenos en superficie o en cápside de los BVs [76, 89, 96-103]. En su

conjunto, las investigaciones sobre los efectos inmunológicos de los BVs mostraron que inducen la activación de diversas células inmunes, con producción de altos niveles de citoquinas e IFNs, así como la producción de IFN de tipo I en células no inmunes, a través, principalmente, de la vía dependiente de TLR9/MyD88 y la vía dependiente de STING. Estos estudios abren un nuevo abanico de aplicaciones potenciales para los baculovirus que merecen ser exploradas.

Desde fines de los años '90 y principios de los 2000, en los que hubo brotes de FA en países que previamente eran libres de la enfermedad como Taiwan, Reino Unido y varios países de Sudamérica entre los que se encuentra Argentina, ha surgido una intensa búsqueda de estrategias antivirales que permitan proteger animales a tiempos cortos contra infecciones con FMDV para que, al aplicarse junto con la vacuna, se reduzca la ventana inmunológica y se logre protección inmediata. Resultados de nuestro grupo mostraron que la administración por vía i.v. de BVs de AcMNPV protege el 100% de los ratones entre las 3 h y los 3 d post inoculación, y que la coinoculación con la vacuna no altera el desarrollo de la respuesta inmune humoral [137, 138].

A pesar de que hay numerosos trabajos en los que se estudia la respuesta inmune innata y el estado antiviral inducido por baculovirus, ningún trabajo se ha enfocado en evaluar qué elementos del sistema inmune son relevantes para lograr protección contra desafíos virales en animales. En esta tesis se estudiaron los mecanismos involucrados en el establecimiento del estado antiviral promovido por los BVs de baculovirus y se hizo foco en la transferencia de esta tecnología del modelo murino a la especie porcina. Está reportado que debido a los altos niveles de amplificación y de secreción de FMDV durante la fase aguda, estos animales son una de las principales fuente de propagación viral durante un brote. La vacunación de los porcinos, contrariamente a la de los bovinos, no es obligatoria en Argentina y sólo reciben la vacuna en situación de brote, haciendo aún más necesario disponer de esta herramienta biotecnológica.

En la primera parte de este trabajo se realizaron dos abordajes distintos para estudiar de qué manera la interacción entre el BV de AcMNPV con el sistema inmune innato lleva a la inducción de un estado antiviral. Por un lado, el estudio se realizó desde la perspectiva de la inmunidad innata, evaluando la importancia y el rol que juegan las células NK y los IFNs en el establecimiento de un estado protector contra FMDV y, por otro lado, desde la

perspectiva del AcMNPV, intentando profundizar en el entendimiento de qué factores virales son necesarios para la vehiculización del genoma en cDCs, la interacción con componentes celulares y la activación de la respuesta inmune.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la acción de los IFNs de tipo I es fundamental para que el BV induzca una protección efectiva *in vivo* contra FMDV en ratones. Por su parte, Emran y colaboradores mostraron recientemente que la protección otorgada por el BV contra *Plasmodium berghei* es independiente de TLR9, y puede ser inhibida totalmente mediante el tratamiento con un anticuerpo neutralizante anti-IFN- α y parcialmente con un anticuerpo neutralizante anti-IFN- γ . Como se mencionó anteriormente, Gronowski y colaboradores ya habían demostrado que la actividad antiviral que inducían los BVs era mediada por IFNs de tipo I. Además, vieron que fibroblastos primarios de ratón IFNAR1^{-/-} no eran protegidos contra una infección con VSV, pero la transferencia de su sobrenadante inducía protección en células MKF. A partir de estos resultados concluyeron que este receptor no es necesario para la producción de IFNs de tipo I, pero sí para que estos mediadores ejerzan sus efectos antivirales [90]. Sin embargo, Abe y colaboradores mostraron que la producción de IFN- α/β inducida por BVs en cDCs y PECs de ratones IFNAR^{-/-} es muy inferior en comparación con células de ratones wt. Además, la producción sistémica de IFNs de tipo I en ratones IFNAR^{-/-} es inferior a la de wt, en especial a las 6 h [73]. Coherentemente con los trabajos previamente publicados, en esta tesis se detectó actividad antiviral contra VSV en suero de ratones IFNAR1^{-/-} 3 h después de la inoculación con BVs, pero los niveles tendieron a ser menores que en C57BL/6 wt. Los IFNs de tipo I promueven su propia expresión a través de la cascada de señalización iniciada en su receptor, por lo que es esperable que la producción de estos mediadores sea menor y que no logre mantenerse en el tiempo.

Por otra parte, en este trabajo se demostró que los ratones IFNAR1^{-/-} inducen niveles normales de IFN- γ luego del estímulo con BVs. Como se mencionó anteriormente, las células NK y NKT fueron descritas como las principales productoras de esta citoquina a tiempos cortos en ratones [76] y los resultados presentados en esta tesis indican que no requieren de efectos de los IFNs de tipo I para llevar a cabo esta función. Por lo tanto, estos resultados contribuyen al entendimiento de las vías necesarias para la inducción de IFN- γ por BVs en ratones.

Mientras que la producción de IFN- γ en ratones depende del impacto directo del BV en los TLR9 de las células NK y del contexto de citoquinas pro-inflamatorias, generado también por el impacto en el TLR9 de otras células inmunes, la producción sistémica de IFN- α/β depende de la activación de las cDCs a través de la vía dependiente de STING. Sin embargo, ratones STING^{-/-} tratados con BVs además de no producir IFN- α/β , tampoco producen IFN- γ a pesar de expresar citoquinas pro-inflamatorias como IL-12. Estos antecedentes indican que la producción sistémica de IFN- γ inducida por BVs en ratones también requiere de alguna señal dependiente de STING. En base a los resultados obtenidos en ratones IFNAR1^{-/-} se observó que los IFNs de tipo I no están involucrados en la inducción de IFNs de tipo II, por lo que es posible que se requiera de otras citoquinas producidas por la vía dependiente de STING para activar su producción.

Las células NK, tal como se mencionó, son activadas por los BVs de baculovirus y cumplen un rol fundamental en las respuestas antitumorales inducidas por estos virus. Kitajima y colaboradores habían visto que la inmunidad antitumoral inducida por AcMNPV dependía de las células NK debido a que la depleción con anticuerpo anti-NK1.1 (PK136) disminuyó dramáticamente la supervivencia de ratones inoculados intraesplénicamente con células de melanoma B16 [93]. Si bien es conocida la importancia de estas células en las respuestas inmunes contra infecciones virales y en particular contra FMDV, su rol en el estado antiviral inducido por BVs no había sido estudiado. En esta tesis se demostró la importancia de las células NK para inducir la protección contra FMDV en ratones mediante la inoculación de BVs de AcMNPV. La depleción de células NK1.1⁺ durante el desafío viral, que impidió el desarrollo de la respuesta mediada por estas células al momento de la infección con FMDV, condujo a que la enfermedad se manifieste con signos clínicos leves en la mayor parte de los ratones. Sin embargo, cuando la depleción de esta población celular también se realizó durante la inmunización con BVs, impidiendo de esta manera que las células NK tampoco cumplan con su función productora de citoquinas, ésta llevó al desarrollo de una enfermedad severa y potencialmente mortal en todos los animales. Además, los resultados mostraron que las células NK son necesarias para la producción de IFN- γ , confirmando lo observado por otros autores [76].

Es importante mencionar que la depleción de células NK mediante el anticuerpo monoclonal contra el antígeno de superficie NK1.1, que es expresado tanto en células NK

como en NKT de ratones de la cepa C57BL/6, no afecta a una pequeña proporción de células NK que son fenotípicamente NK1.1⁻ DX5⁺. Esta descripción que la citotoxicidad mediada por las células NK DX5⁺ es muy superior a la mediada por células NK DX5⁻, lo cual sugiere que mediante la depleción realizada en este trabajo se disminuyó fuertemente el número de células NK y NKT en los ratones, pero existe una pequeña población remanente de estas células ejerciendo un rol citotóxico [156].

Los experimentos presentados en el estudio del estado antiviral inducido por BVs desde la perspectiva del sistema inmune innato, permiten concluir que los IFNs de tipo I son fundamentales para inducir protección, pero el retraso observado en la mortalidad de los animales sugiere que hay más elementos involucrados. Por otro lado, las células NK también juegan un rol importante en el desarrollo del estado antiviral en este modelo debido a que su respuesta es fundamental para evitar que la enfermedad se manifieste y se vuelva severa y potencialmente mortal.

La inmunidad innata responde a la interacción de sus PRRs con factores virales, por lo que resulta de gran importancia también estudiar la inducción del estado antiviral desde la perspectiva de los componentes estructurales de los virus. En esta tesis se estudió al BV como vector, responsable de vehiculizar el ADN para impactar en el TLR9 y en sensores de ADN citosólico. El ODV, que vehiculiza el mismo genoma pero difiere principalmente en la envoltura, no indujo al ser inoculado por la vía i.v. la generación de actividad antiviral ni la producción de IFN- γ en el suero de los animales. Además, resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que los viriones del fenotipo ocluido, contrariamente a los del fenotipo brotado, no fueron capaces de inducir IL-12 ni IL-6 en ratones [150]. Resultados similares fueron reportados por Niu y colaboradores al tratar una línea celular de macrófago de pollo con ODVs de ApNPV, pero su ADN formulado con liposomas tuvo éxito en promover IL-12 e IFN- γ en estas células [91]. Estos antecedentes sugieren la funcionalidad de los PAMPs y que la falta de respuesta podría deberse a la incapacidad de entrar en células inmune o a una deslocalización entre el agonista y su receptor.

Las cDCs tienen una alta capacidad endocítica y un rol central en la respuesta inmune innata. Hervas-Stubbs y colaboradores mostraron que son fundamentales para la producción de IFNs de tipo I y de tipo II y de citoquinas pro-inflamatorias, todos factores necesarios para inducir el estado antiviral por BVs [71]. Por lo tanto, debido a que la activación de su

maduración es considerada un punto clave para iniciar la respuesta antiviral, se decidió estudiar la interacción de los baculovirus con BMDCs. Previamente habíamos descripto que los ODVs no son capaces de madurar BMDCs, debido a que no inducen el aumento en la expresión de CD86, MHC II ni de IL-6, contrariamente a los BVs [150]. Por lo tanto, en este trabajo se hizo foco en el estudio del tráfico intracelular de ambos fenotipos en dichas células y se observó que, a pesar de que ambos viriones fueron detectados en compartimentos lisosomales, los BVs tienen un destino intracelular distinto en el que se detectó la presencia de enzimas proteolíticas. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la deslocalización de los ODVs y los PRRs capaces de sensor su genoma son la causa de su incapacidad para inducir la inmunidad innata.

Las proteínas de la envoltura son las responsables de las interacciones primarias con ligandos celulares, iniciando una cascada de eventos que modulan el destino del virión. Ambos fenotipos difieren en el origen y la naturaleza de su envoltura, y los ODVs carecen de la GP64. Por esta razón, debido a que esta glicoproteína está involucrada en la adsorción, la endocitosis y el escape al citoplasma de BVs en células de mamíferos, en este trabajo se evaluó el efecto de la neutralización de GP64 con un anticuerpo monoclonal en la maduración de BMDCs por estos virus. A pesar de que los BVs neutralizados con AcV1 perdieron la capacidad para inducir citoquinas, sorpresivamente indujeron el incremento en la expresión de marcadores fenotípicos de maduración (CD86 y MHC II). Si bien su incapacidad para inducir citoquinas sugiere que no impactan en las vías de activación de la inmunidad innata ya discutidas, dado que están neutralizados por un anticuerpo IgG2a es posible que el reconocimiento mediante un RFc haya llevado a la expresión de moléculas coestimuladoras. Los ligandos fisiológicos de estos RFc son los anticuerpos IgG en complejos inmunes, es decir, en asociaciones antígeno-anticuerpo, y muchos de ellos median una señalización que activadora para la respuesta de células inmunes. También se estudió el efecto de la pérdida de funcionalidad de GP64 sobre el impacto del BV en BMDCs. Al realizarle a estos virus un *shock* de pH que imita las condiciones endosomales, se produce un cambio conformacional de la estructura de GP64 haciendo que pierda irreversiblemente su actividad fusogénica. La incapacidad de estos viriones para madurar BMDCs sugiere que no pueden inducir las vías de activación de la inmunidad innata. Gronowski y colaboradores tuvieron un resultado similar al neutralizar los BVs con anticuerpo monoclonal anti-GP64, lo cual inhibió la

inducción de IFNs- α/β en la línea celular de macrófago RAW264.7. Distintos trabajos mostraron que los BVs, al ser tratados con calor o irradiados con UV, pierden la capacidad de inducir actividad antiviral en esplenocitos murinos y de inducir la producción de citoquinas en RAW264.7. Sin embargo, la capacidad inmunoestimuladora de los BVs inactivados por luz UV se reestablece al ser vehiculizados con liposomas. Dado que el genoma demostró seguir siendo capaz de inducir la respuesta inmune en estas condiciones, los autores de este trabajo concluyeron que es posible que el tratamiento con luz UV desnaturalice la proteína GP64. Además, mostraron que los BVs de AcMNPV Δ 64, es decir de un mutante que no expresa GP64, no inducen la producción de TNF- α en RAW264.7. Nuestros resultados, junto con los antecedentes publicados, suman evidencias a favor de la necesidad de que la proteína GP64 esté presente en los BVs y sea funcional para inducir las distintas vías de activación de la respuesta inmune innata [72, 89, 90]

Actualmente, está en discusión si GP64 cumple estrictamente un rol en la entrada del BV, y por lo tanto, en la vehiculización del genoma en células de mamíferos o también es capaz de inducir algún tipo de señalización en vías de activación de la inmunidad innata. Abe y colaboradores mostraron que una versión soluble de esta proteína expresada en células de insecto sin su región transmembrana (GP64 Δ TM) no indujo la producción de TNF- α , IL-6 ni IFN- α en RAW264.7, ni de IFN- α e IL-12 en PECs. Sin embargo, en cDCs indujo niveles bajos de IL-12, pero no de IFN- α . Los autores discuten en su trabajo que aunque GP64 no sea responsable directo de la fuerte inducción de la respuesta inmune innata inducida por BVs, es probable que esta proteína sea capaz de activar alguna vía de señalización. Por otro lado, el pretratamiento de las células RAW264.7 con GP64 Δ TM antes del agregado de BVs de AcMNPV impidió la inducción de TNF- α , indicando que la interacción del BV a través de GP64 con la superficie celular es un suceso necesario para que se active la producción de citoquinas [72, 73]

A pesar de que los ODVs tienen una compleja composición en su envoltura y hay antecedentes que muestran que pueden entrar en líneas celulares de vertebrados, es probable que la falta de GP64 sea responsable de que estos viriones lleguen a un endosoma distinto y sean incapaces de activar la vía dependiente de TLR9. Ciertos trabajos demostraron que los TLR9 residen en el retículo endoplasmático y son reclutados a los lisosomas a través del complejo de Golgi sólo después de que las células son estimuladas con ODNs CpG, aunque

los mecanismos involucrados son desconocidos [157-159]. Además, Guiducci y colaboradores demostraron en pDCs humanas que la localización endosomal determina la respuesta biológica activada por los ODNs CpG mediante TLR9, es decir que la naturaleza de la señalización varía según el compartimento al que se trafique la molécula [160]. Por otro lado, es posible que en ausencia de GP64 los viriones no puedan escapar al citoplasma, comprometiendo también la activación de las vías dependientes de STING. De todas maneras, no podemos descartar que las proteínas PIF u otros componentes estructurales de los ODVs, así como otros componentes de los BVs puedan estar interactuando con las células murinas influyendo en el destino final de sus genomas.

En esta tesis se mostró por primera vez que vectores baculovirales sin GP64 (los ODVs) pueden entrar en células inmunes pero siguen un tráfico endosomal distinto al de BVs. Además, nunca antes se había evaluado la posibilidad de inducir actividad antiviral mediante la utilización de ODVs. La baja inmunogenicidad de estos viriones es una característica deseada en vectores para terapia génica *in vivo*, por lo que el estudio de estos virus podría resultar útil para el desarrollo de nuevos vectores mediante ingeniería genética con estos fines.

Dada la importancia de la interacción de GP64 con células de mamífero para lograr la inducción de la respuesta inmune, en esta tesis se estudió la posibilidad de que GP64 sea agonista de algún receptor de superficie. Debido a la presencia de residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina en GP64, es posible que esta proteína medie la captura del BV a través de un CLR. Las lectinas de tipo C son una superfamilia de proteínas de reconocimiento de carbohidratos de manera Ca^{2+} -dependiente. Estas proteínas son especialmente cruciales para la protección contra infecciones microbianas en insectos debido a que sólo cuentan con un sistema inmune innato. En este trabajo, a partir de la secuencia del CLR soluble de *M. domestica* capaz de neutralizar los BVs de AcMNPV, MdCTL1, se halló que el MR es la proteína murina con más probabilidades de tener un origen evolutivo en común. Si sus dominios de reconocimiento de carbohidratos están conservados, el MR también debería ser capaz de interactuar con el BV. Por otra parte, el pretratamiento de BMDCs con manano, un agonista de algunos CLRs como el MR, tendió a reducir la entrada de virus en estas células. De esta manera, se postula la hipótesis de que el MR u otros CLRs presentes en las células inmunes podrían estar involucrados en la endocitosis de los BVs a través de GP64, lo

cual podría llevar a que estos viriones alcancen un destino diferencial e impacten en la respuesta inmune innata.

El MR es un CLR transmembrana expresado en ciertas poblaciones de macrófagos y DCs y en los endotelios hepático y linfático. Este receptor reconoce una amplia variedad de bacterias (estreptococos, *Klebsiella*, micobacterias), virus (HIV) y hongos (*Candida*, *Aspergillus*, *Criptococcus*), a través del reconocimiento de manosa, fucosa y N-acetil glucosamina, presentes en su superficie y está involucrado en la unión y fagocitosis de estos microorganismos por parte de DCs y macrófagos. Se ha descrito que los ODNs CpG deben ser capturados por el MR o por el receptor DEC-205, otro CLR, para impactar en células inmunes a través de la vía TLR9/MyD88. Moseman y colaboradores describieron que el MR está involucrado en la endocitosis y el tráfico endolisosomal de ODNs CpG en células inmunes, incluyendo BMDCs, y que es necesario para que estas moléculas induzcan la respuesta inmune [161]. Por otro lado, la proteína OVA soluble, con la cual se demostró en esta tesis que colocaliza el BV pero no el ODV, también es capturada por BMDCs a través del MR [152]. Es probable que la endocitosis de moléculas o agentes microbianos a través del MR u otros CLRs haya sido seleccionada evolutivamente para que alcancen vesículas en las sean capaces de activar la vía dependiente de TLR9/MyD88. Estudiar más detalladamente esta posible vía de entrada y el subsiguiente tráfico endosomal podría no sólo ayudar a comprender en mayor profundidad los mecanismos involucrados en el establecimiento de la respuesta inmune innata y adaptativa inducida por BVs de AcMNPV, sino también podría aportar conocimientos de gran importancia para el desarrollo de vacunas e inmunomoduladores.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis destacan la importancia de la producción de IFNs, de la activación de células NK y de la interacción del BV con DCs a través de GP64 para la inducción de un estado antiviral (Figura D1). Integrando estos resultados con los antecedentes publicados, se puede concluir que los BVs de baculovirus deben impactar en las cDCs por la vía dependiente de STING para llevar así a la producción sistémica de IFNs de tipo I, siendo estas células aún más importantes que las pDCs en el modelo murino [71]. Además, la maduración de las cDCs por la vía dependiente de TLR9 es necesaria para que estas células produzcan citoquinas proinflamatorias, necesarias para la activación de otras células inmunes como las células NK. Por un lado, para que se produzca

la activación de la vía dependiente de STING, es necesario que el BV escape de los endosomas al citosol mediante la actividad fusogénica de GP64. Por otro lado, para la activación de la vía dependiente de TLR9/MyD88 es necesario que el BV, al parecer mediante GP64, vehicule su genoma a ciertos compartimentos lisosomales. En esta tesis se presentan evidencias a favor de la hipótesis de que GP64 sea agonista de uno o varios CLRs, proponiéndose al MR como un candidato. Por su parte, las células NK, además del contexto de citoquinas, requieren del impacto directo del BV también por la vía dependiente de TLR9 [77]. Una vez activadas, estas células son las principales productoras de IFN- γ y cumplen también un rol importante eliminando las células infectadas mediante su función citotóxica. La acción de estas células, en conjunto con la expresión de ISGs inducida por los IFNs a través sus receptores en la superficie de las células no inmunes, son factores fundamentales para lograr la protección total contra un desafío con FMDV en el modelo murino y en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Sin embargo, no se puede descartar que haya más componentes del sistema inmune innato participando activamente en esta respuesta.

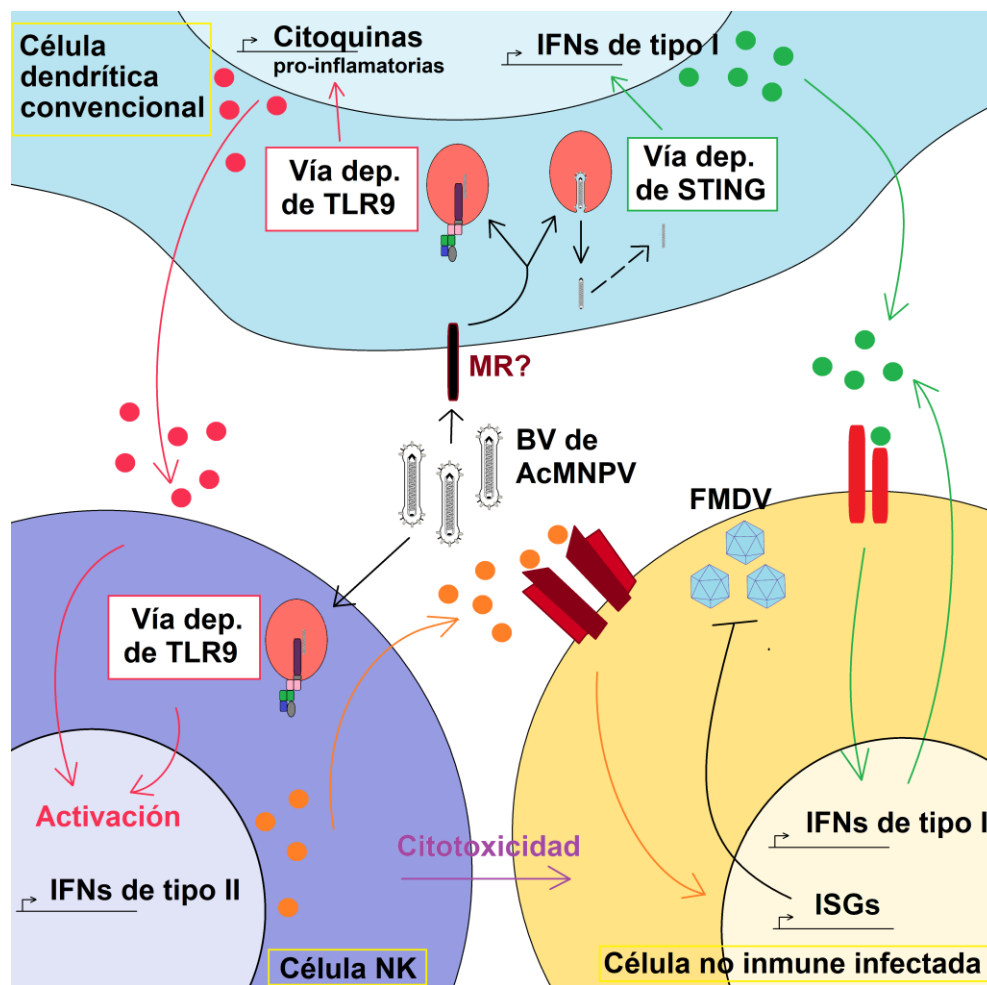


Figura D1. Esquema del establecimiento del estado antiviral inducido por BVs de AcMNPV. El BV de AcMNPV induce la producción de IFNs de tipo I en cDCs por la vía dependiente de STING, y de citoquinas pro-inflamatorias por la vía dependiente de TLR9. Por otro lado, las células NK no sólo requieren de un contexto de citoquinas para su activación, también es necesaria de la interacción directa con el BV mediante el receptor TLR9. La protección contra una infección con FMDV se da por el accionar de los IFNs, que a través de sus receptores conducen a la expresión de ISGs, y por la respuesta inmune mediada por células NK.

En la segunda parte de esta tesis se planteó la factibilidad de utilizar esta herramienta biotecnológica para la solución de un problema clínico. La FA es la enfermedad veterinaria de mayor impacto económico en el mundo y, como ya se mencionó, existe una búsqueda a nivel mundial de estrategias de este tipo para contener la enfermedad durante brotes hasta que la inmunidad humoral establecida por la vacuna sea efectiva para proteger los animales. Es importante destacar también que el FMDV es uno de los virus de mayor morbilidad y la

especie porcina es especialmente susceptible a esta enfermedad. El grupo de los Dres. Teresa de los Santos y Marvin Grubman ha investigado el uso de Ad5 expresando IFNs por más de una década y han obtenido alentadores resultados expresando IFNs de tipo I, II y III, y la fusión IRF3/IRF5 como factor de transcripción constitutivo en los animales. Sin embargo, el uso de estas estrategias también conlleva ciertas desventajas, tales como los efectos negativos de la respuesta previa contra el vector sobre los niveles de transducción *in vivo*. Además, esto significaría que la estrategia no puede ser utilizada en dosis repetidas, o que el desarrollo de una vacuna vectorizada con Ad5 impediría el uso posterior de esta herramienta. Si bien la respuesta previa contra el BV de AcMNPV también interfiere en estrategias de expresión de genes *in vivo* [162], no afecta negativamente el desarrollo de la respuesta inmune innata ni el establecimiento de un nuevo estado antiviral protector contra FMDV. Incluso se detectó que las células NK producen niveles mayores de IFN- γ frente al reestímulo con BVs de AcMNPV (resultados no publicados de nuestro grupo).

Alves y colaboradores evaluaron el efecto de la inoculación i.m. de ODNs CpG en cerdos y, a pesar del éxito de esta estrategia en ratones, de la capacidad inmunoestimuladora de estas moléculas en células porcinas y de haber inducido la respuesta inmune innata en los animales, no lograron otorgar protección contra FMDV desafiando a los 2 días post inoculación [134]. Si bien los BVs también impactan por la vía dependiente de TLR9, estos resultados no son suficientes para inferir las propiedades inmunoestimuladoras de los baculovirus. La activación de la vía de TLR9 depende de la vehiculización y el destino celular del ADN y, además, los BVs también podrían ser capaces de inducir otras vías de señalización en esta especie, al igual que en ratones.

El uso de baculovirus surge como una alternativa prometedora y segura, debido a su baja citotoxicidad y a que no hay evidencias de replicación viral en células de vertebrados. Si bien no hay estudios realizados sobre la inmunidad innata inducida por baculovirus en cerdos, existen algunos trabajos en los que se usan estos virus como vectores vacunales en esta especie. Específicamente, se han obtenido buenos resultados al evaluar la inmunidad adaptativa generada por baculovirus recombinantes que expresan antígenos heterólogos *in vivo* [163, 164], y por su uso como vector vacunal basado en el *display* de antígenos en superficie [165].

En esta tesis se utilizaron CMSPs porcinas debido a que se encuentran presentes las principales poblaciones de células inmunes, por lo que podrían representar un buen modelo *ex vivo* para evaluar los efectos del BV de AcMNPV antes de realizar el estudio *in vivo*. Auray y colaboradores estudiaron en profundidad la expresión y función de los PRRs en las distintas poblaciones de DCs y en monocitos de CMSPs porcinas. Por un lado, detectaron que los monocitos expresan en altos niveles la mayoría de los PRRs evaluados, incluyendo TLR9. Por otro lado, demostraron que el receptor TLR9 es expresado en muy altos niveles en pDCs y en niveles relativamente altos en cDC1, como sucede en otras especies. Además, describieron que como consecuencia del tratamiento con ODNs CpG hubo una producción de citoquinas (IFN- α , TNF- α , IL-12p40 e IL-12p35) muy superior en pDCs con respecto a los demás tipos celulares y que las cDCs aumentaron la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40 y CD80/86). Sin embargo, la activación de cDCs fue dependiente de la presencia de pDCs en el cultivo celular, sugiriendo que requieren del contexto de citoquinas producido por estas células. Los autores discuten que mientras que las cDCs parecen tener un rol casi exclusivamente relacionado con la presentación antigénica, las pDCs parecen ser especialmente importantes en la producción de citoquinas en esta especie [53]. En base a estos antecedentes y a que los BVs inducen la vía dependiente de TLR9 en ratones, es posible que estos virus induzcan la producción de IFNs y citoquinas pro-inflamatorias a través de pDCs, así como la maduración de cDCs. Por su parte, también se reportó que la proteína STING se expresa en células porcinas y cumple un rol importante en la respuesta inmune innata de esta especie, conduciendo a la expresión de IFNs de tipo I [166]. Aún no hay estudios publicados sobre la activación de esta vía en CMSPs, por lo cual resultaría interesante estudiar que células inmunes son activadas para producir IFNs de tipo I por BVs.

En este trabajo se demostró que el BV de AcMNPV induce altos niveles de actividad antiviral mediada por IFN- α en CMSPs, aunque también se sugiere la existencia de otros IFNs involucrados en esta respuesta. Para estudiar en mayor profundidad la respuesta inducida, se estudiaron las células productoras de IFN- α , pudiendo distinguir tres poblaciones en base al nivel de expresión de SWC3. El 7% de las células SWC3^{low} produjeron IFN- α , lo cual representa el 0,1% de las CMSPs totales. Considerando que las principales productoras de IFN- α son las pDCs porcinas, que se caracterizan fenotípicamente por ser SWC3^{low} y

CD4⁺ y que su frecuencia es del 0,1-0,3% en CMSPs [167], es posible que el BV de AcMNPV haya inducido la producción de IFN- α en un porcentaje elevado de pDCs. Aunque las cDCs1 también son fenotípicamente SWC3^{low}, Auray y colaboradores mostraron que no son buenas productoras de IFN- α frente a inmunomoduladores. En ratones, las pDCs también son las células que producen mayores cantidades de IFN- α al ser tratadas con BVs, pero su aporte a la producción sistémica de IFNs de tipo I es insignificante en comparación a las cDCs [71]. Será necesario determinar en mayor profundidad si las células más importantes a las cuales debe apuntar esta estrategia en cerdos son las cDCs o las pDCs. En conjunto, estos datos son un fuerte indicio de que los BVs son capaces de inducir la producción de IFN- α en una gran proporción de las pDCs, aunque con los experimentos realizados no se puede descartar que las cDCs y los monocitos también produzcan IFN- α por inducción del BV.

En cuanto a la identificación de las células productoras de IFN- γ , en este trabajo se detectó que una proporción importante de linfocitos CD3⁻ producen esta citoquina por estímulo del BV. Entre los linfocitos CD3⁻ de cerdos se distinguen las células CD8 α ⁻, correspondientes a los linfocitos B, y las CD8 α ⁺, correspondientes a las células NK [168]. Esto significa que los resultados de esta tesis presentan un fuerte indicio de que los BVs son capaces de activar la producción de IFN- γ en células NK porcinas. Debido a que los IFNs de tipo II inducen actividad antiviral contra FMDV en cerdos, la detección de la producción de esta citoquina resulta de gran relevancia para evaluar si es posible otorgar protección contra FMDV mediante esta estrategia. Debido a que la respuesta mediada por células NK durante el desafío con FMDV demostró ser importante en el modelo murino, resultará interesante estudiar si también hay activación fenotípica de estas células en cerdos y si al ser tratadas con BVs se incrementa la citotoxicidad contra células infectadas con FMDV.

Las células no inmunes murinas también responden al BV mediante la producción de IFNs de tipo I, principalmente IFN- β . Si bien células no inmunes de origen porcino luego de ser tratadas con BVs son protegidas contra una infección con VSV (células PK15 e IBRS-2) o con FMDV (células LFBK), la actividad antiviral en su sobrenadante es prácticamente indetectable (resultados no mostrados). Por lo tanto, la baja inducción de actividad antiviral en estas células no parece tener un rol importante en el establecimiento de un estado antiviral sistémico. Los altos efectos obtenidos en CMSPs porcinas sugieren que las células inmunes de cerdos son las principales responsables de generar actividad antiviral.

Durante este trabajo se comprobó que los BVs activan la producción de IFNs de tipo I y de tipo II en CMSPs porcinas mediante la activación de las vías de señalización naturales de la respuesta inmune innata. Estos altos niveles de mediadores antivirales fueron capaces de proteger células no inmunes porcinas de la línea celular LFBK frente a un desafío *in vitro* con FMDV, demostrando la capacidad del BV de AcMNPV de inducir actividad antiviral contra este virus en células inmunes porcinas *ex vivo*.

Para estudiar el efecto inmunomodulador del baculovirus incorporando la complejidad del cerdo como sistema biológico, se evaluó la inducción de mediadores antivirales *in vivo* en estos animales. La cinética de producción de IFN- α , de actividad antiviral contra VSV y de actividad antiviral contra FMDV, que mostraron que la máxima producción de mediadores antivirales ocurre durante las primeras 6 h post inoculación, sugiere la existencia de mecanismos inductores similares a los de la especie murina. A pesar de que la relación de masa entre ratones y cerdos utilizados es de aproximadamente 1:1000 y la de volemia de 1:800, la dosis de 1×10^9 UFPs por cerdo, tan sólo 20 veces mayor a la utilizada en ratones (5×10^7 UFPs), fue eficaz para la generación de actividad antiviral. Este dato sugiere no sólo una alta sensibilidad de la respuesta inmune de estos animales a los BVs, sino también que podrían esperarse niveles aún mayores de IFNs en sangre utilizando una dosis mayor de BVs.

El grupo del Dr. Marvin Grubman logró conferir protección total a cerdos contra distintos serotipos de FMDV utilizando entre 1×10^8 y 1×10^{11} UFPs de un vector adenoviral que expresa IFN- α porcino (Ad5-pIFN- α). Mediante esta estrategia los investigadores vieron que para otorgar protección, al día 1 post inoculación debían obtener niveles de al menos entre de 16.000 y 28.000 pg/ml de IFN- α , dependiendo del experimento realizado. Su estrategia se basó en la expresión de IFN- α , por lo que los niveles que alcanzaron son mucho mayores a los de este trabajo, en el que logramos un promedio de 1.272 pg/ml de IFN- α . Sin embargo, mediante la estrategia presentada en esta tesis se induce la producción de distintos tipos de IFNs, demostrándose la expresión de al menos IFN- α e IFN- γ que, como ya se mencionó, actúan sinérgicamente en la inducción de protección contra FMDV en cerdos. Por otra parte, en términos de actividad antiviral, los autores de estos trabajos vieron para obtener protección mediante Ad5-pIFN- α se debía inducir una actividad antiviral de al menos entre 400 y 1300 U/ml, según el experimento [127, 128]. Los niveles de actividad antiviral de estas

publicaciones son expresados como la inversa de la dilución de muestra en la cual se protege el 50% de las células IBRS-2 contra FMDV. Si bien esa expresión es relativa a su ensayo, en los experimentos realizados para esta tesis también se obtuvieron niveles muy altos de actividad antiviral a las 3 h post inoculación que, al expresarse de esta misma forma, resulta en un promedio de 807,3 U/ml, con valores que oscilan desde 90 U/ml hasta 2048 U/ml. Es decir que al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los antecedentes publicados, se puede concluir que al menos algunos de los cerdos mostraron valores de actividad antiviral contra FMDV a las 3 h post inoculación que sugieren que resultarían protegidos frente a un desafío contra FMDV. Además, es posible que los BVs induzcan otros mecanismos de la respuesta inmune innata además de la producción de IFNs tales como la activación de células NK que potencien aún más la protección contra un desafío viral.

Este es el primer trabajo en el que se estudia la respuesta inmune innata promovida por baculovirus en cerdos, por lo que las vías de activación que inducen en esta especie son desconocidas. En base a los mecanismos mediante los cuales los BVs activan la inmunidad innata en ratones, se diseñaron dos baculovirus recombinantes con el fin de optimizar el impacto en la generación de actividad antiviral. Dado que los resultados obtenidos en cerdos *in vivo* fueron similares a los extraídos de experimentos *ex vivo*, la utilización de CMSPs resultó ser un buen modelo para estudiar el efecto de los baculovirus previamente a la inoculación de animales. Por lo tanto, el efecto de los virus recombinantes se comparó con el de AcMNPV wt en estas células.

El enriquecimiento del genoma de baculovirus en secuencias CpG que habían demostrado ser inductoras de la respuesta inmune porcina no produjo mejoras medibles en lo que es la promoción de IFN- α y actividad antiviral en sobrenadante de CMSPs. Es posible que los baculovirus ya contengan en su genoma motivos CpG suficientes para impactar eficientemente en los receptores TLR9 de cerdos. De todas formas, es importante mencionar que con los experimentos realizados no es posible descartar que haya un efecto diferencial sobre tipos celulares específicos. Tal como se discutió previamente, la producción de IFN- α en pDCs depende de esta vía, al igual que la maduración de cDCs. En ratones, esta vía también está involucrada en la activación de células NK. Se requiere una evaluación más específica sobre los tipos celulares mencionados para poder concluir de manera contundente acerca de los efectos del virus Ac-pCpG en la inmunidad innata de cerdos. Por otra parte, los

resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo también sugieren que una forma de mejorar el impacto de los baculovirus a través de los TLR9 podría ser vehiculizando los viriones de manera más eficiente a vesículas lisosomales a las cuales sean reclutados estos receptores.

Por otro lado, aunque los baculovirus son eficientes en la entrada en células de mamíferos, especialmente en hepatocitos, se ha reportado que modificaciones en las proteínas de envoltura incrementan la transducción. La proteína G de VSV es la más utilizada para pseudotipar BVs de baculovirus con estos fines. No está descrito si este efecto se debe a un aumento en la adsorción mediada por esta proteína, en la endocitosis, o en el escape al citoplasma. De todas formas, si hay un mayor número de nucleocápsides alcanzando el núcleo probablemente haya también un aumento en el número de BVs en citoplasma. Esto podría significar un mayor *delivery* del genoma baculoviral a sensores de ADN citosólico. Este trabajo mostró que el pseudotipado con la glicoproteína G de VSV produce un aumento de aproximadamente el doble en la inducción de IFN- α y actividad antiviral. Por otra parte, el virus Ac-GVSV podría ser más eficiente también en la inducción de otros parámetros de la respuesta inmune que merecen ser explorados.

Está reportado que la proteína G de VSV tiene actividad fusogénica a pH 6,4 [169]. De hecho, en esta tesis se mostró que la expresión de esta proteína induce la formación de sincicios en células Sf9 a pH 6,2. Los baculovirus son producidos en medio de cultivo de células de insecto, que se encuentra a este pH, y su actividad fusogénica requiere de un medio aún más ácido. Esta diferencia podría significar que la proteína G de VSV medie el escape del BV al citoplasma con mayor facilidad que GP64, requiriendo una menor maduración endosomal. Existen otras estrategias para aumentar la transducción del BV en células de mamíferos, tales como generar un exceso en la cantidad de GP64 expresada o utilizar mutantes de esta proteína, así como pseudotipar las partículas con glicoproteína del virus de la rabia o del virus de la hepatitis murina, con neuraminidasa del virus influenza o con proteína F de *Spodoptera exigua multiple nucleopolyedrovirus* (SeMNPV) [14]. De la misma forma en que el pseudotipado del BV con proteína G de VSV aumenta el impacto en la generación de actividad antiviral, es posible que estas estrategias logren efectos similares.

En la segunda parte de este trabajo se demostró la capacidad del BV de AcMNPV de inducir actividad antiviral a través de la inducción de IFNs tales como IFN- α e IFN- γ .

Además, se sugirió que las pDCs y las células NK son las mayores productoras de IFNs de tipo I y II respectivamente. Los altos niveles de mediadores antivirales inducidos por los BVs en cerdos son un indicio de que esta estrategia podría inducir protección contra infecciones con FMDV. Además, se mostró que incluso se puede optimizar biotecnológicamente esta herramienta, siendo posible obtener aún mejores resultados.

Finalmente, esta tesis contribuyó al conocimiento acerca de la inducción de la respuesta inmune innata por BVs de AcMNPV en ratones. A partir de los resultados presentados, se logró una mayor comprensión de los requerimientos para establecer un estado antiviral en el modelo murino, tanto desde la perspectiva del sistema inmune innato como del vector viral. Por otro lado, la evaluación por primera vez del BV como inductor de actividad antiviral en mamíferos de interés veterinario constituye un paso clave para el desarrollo de una estrategia que permita el rápido control de FA u otras enfermedades infecciosas. Esta herramienta biotecnológica podría ser especialmente relevante durante brotes en países libres de FA sin vacunación de cerdos, como en Argentina, o cuando las vacunas no incluyen los serotipos responsables del brote. El sistema BEVS es utilizado actualmente para la producción de varias vacunas disponibles en el mercado, incluyendo vacunas humanas contra el virus del papiloma humano (Cervarix, GlaxoSmithKline) y del virus influenza (Flublok, Protein Sciences), así como de vacunas veterinarias contra el virus de la fiebre porcina clásica (Porcilis Pesti, MSD Animal Health) y el circovirus porcino tipo 2 (Porcilis PCV, MSD Animal Health; CircoFLEX, B. Ingelheim). Sin embargo, debido a los controles regulatorios, las proteínas son purificadas para que no contengan baculovirus contaminantes. En Argentina, la empresa Sinergium está desarrollando una planta para la producción de vacunas producidas mediante BEVS. Por otro lado, Biogénesis Bagó es la compañía líder en producción de vacunas contra FMDV en Latinoamérica. Además, las vacunas contra FMDV producidas en Argentina son exportadas a Corea del Sur, Vietnam y Taiwan y recientemente habilitaron una planta en China con capacidad de producción de 400 millones de dosis anuales. Por su nivel tecnológico, esta planta es la más moderna del mundo, convirtiéndose así en los mayores productores de vacunas antiaftosa y en la compañía de referencia mundial. Debido a este contexto, el desarrollo de la estrategia planteada en esta tesis podría ser de gran interés industrial a nivel nacional.

Conclusiones

- El estado antiviral inducido por BVs de AcMNPV capaz de proteger ratones contra un desafío con FMDV depende principalmente de la acción de los IFNs de tipo I.
- Para que el estado antiviral contra FMDV inducido por BV en el modelo murino sea eficaz e impida el desarrollo de la enfermedad, se requiere de la respuesta inmune mediada por células NK.
- Los BVs y los ODVs difieren en su capacidad inmunoestimuladora y en su destino intracelular en BMDCs.
- La funcionalidad de GP64 es fundamental para que el BV induzca la maduración de BMDCs.
- Los resultados presentados en este trabajo sugieren la participación de CLR, posiblemente el MR, en la captura de BVs a través de GP64.
- Los BVs inducen IFNs de tipo I y II y, por lo tanto, actividad antiviral en células inmunes de sangre periférica porcina.
- Los BVs demostraron ser un buen agente inductor de actividad antiviral en cerdos.
- Los altos niveles de actividad antiviral contra FMDV obtenidos mediante la administración de BVs en cerdos sugieren que es posible emplear esta herramienta para el desarrollo de una estrategia antiviral contra este virus.
- Es posible optimizar biotecnológicamente el impacto de estos virus en la inducción de actividad antiviral como se demostró mediante el pseudotipado con la glicoproteína G de VSV.

Anexo

AGAATTCGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTATTTTCGAAATAGG
 GGGGGCTAGACGTTAGCGTGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTA
 TTTCGAAATAGGGGGGGCTAGACGTTAGCGTGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATG
 CAGGGGGGGGTATTTTCGAAATAGGGGGGGCTAGACGTTAGCGTGGGGGACGATCGTCGGGGGG
 GGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTATTTTCGAAATAGGGGGGGCTAGACGTTAGCGTGGGGGACG
 ATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTATTTTCGAAATAGGGGGGGCTAGACGTTA
 GCGTGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGTGCATCGATGCAGGGGGGGGTATTTTCGAAATAGGGGG
 GGCTAGACGTTAGCGTGAATTCA

Figura A1: Construcción pCpG. La construcción, compuesta de 4 secuencias CpG que impactan en TLR9 porcino fueron sintetizadas en 6 repeticiones y flanqueadas con la secuencia para la enzima de restricción EcoRI.

Días post desafío	wt / mock	wt / BV	IFNAR1 KO / mock	IFNAR1 KO / BV
0	0	0	0	0
1	1,5	0	5,25	3,5
2	11	0	11	7,75
3		0		7,5
4		0		4
7		0		11

Tabla A1: Scores clínicos obtenidos en el estudio del rol de los IFNs de tipo I en el estado antiviral inducido por BVs en ratones. Grupos de ratones hembra de entre 8 y 9 semanas de edad de la cepa C57BL/6 wt (n = 8) o IFNAR1^{-/-} (n = 4) fueron inoculados i.v. con *mock* infección o BVs y desafiados con 2x10⁴ UFPs de FMDV a las 72 h con el esquema de inmunizaciones mostrado en la Figura R3. Los ratones fueron monitoreados diariamente por siete días y se evaluaron los signos clínicos. El *score clínico* se calculó como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se muestra el promedio obtenido por día para cada grupo.

Días post desafío	NK1.1 / BV / NK1.1	BV / NK1.1	BV	mock	mock / NK1.1
0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1,5	3,125
2	1	1,25	0	11	11
3	0,625	1	0		
4	4,75	1,125	0		
7	1,625	1,125	0		

Tabla A2: Scores clínicos obtenidos en el estudio del rol de las células NK en el establecimiento de un estado antiviral en ratones. Grupos de ratones ($n = 8$) de entre 8 y 9 semanas de edad hembras de la cepa C57BL/6 wt fueron inoculados i.p. con anticuerpo anti-NK1.1, i.v. con mock de infección o BVs y desafiados con 2×10^4 UFPs de FMDV a las 72 h según el esquema de inmunización mostrado en la Figura R6. Los ratones fueron monitoreados diariamente por 7 días y se evaluaron los signos clínicos. El *score clínico* se calculó como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se muestra el promedio obtenido por día para cada grupo.

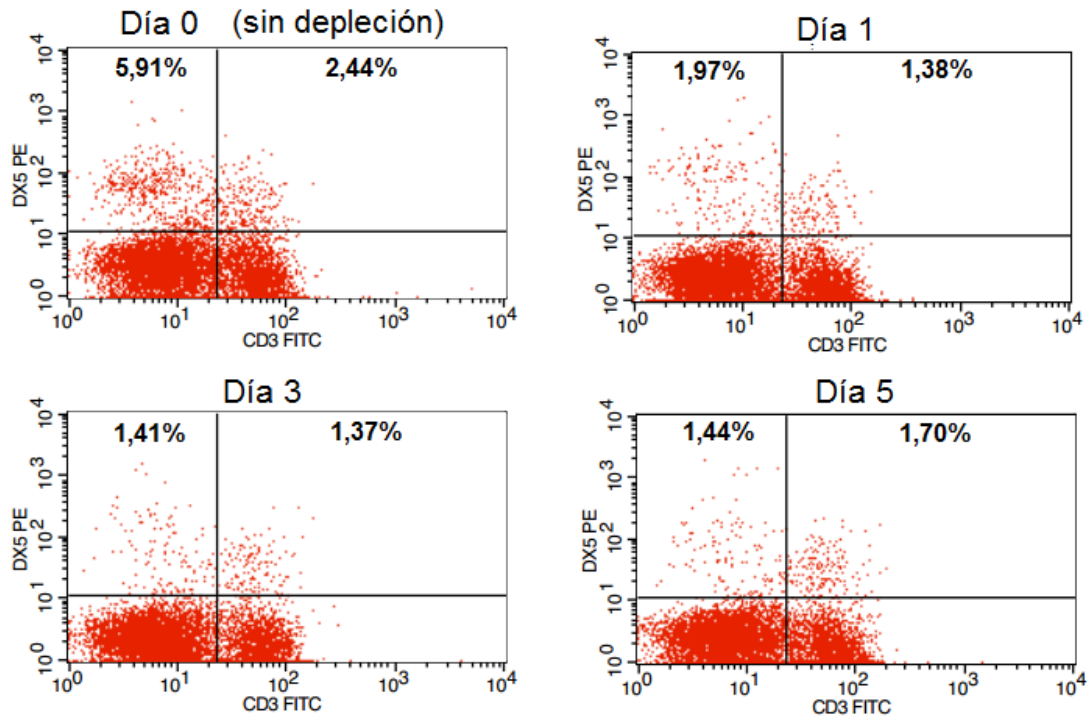


Figura A3: Depleción de células NK y NKT. Ratones C57BL/6 fueron inoculados por vía i.p. con anticuerpo anti-NK1.1 (PK136) 5, 3 o 1 día antes de ser sacrificados. Se disgregaron los bazo, y los esplenocitos fueron marcados con anticuerpo DX5 PE o anti-CD3e FITC y analizados por citometría de flujo en comparación con esplenocitos de un ratón control.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: C-type mannose receptor 2 isoform X1 [Mus musculus]	58.9	58.9	100%	1e-13	34.23%	XP_006532469.1
C-type mannose receptor 2 precursor [Mus musculus]	58.9	58.9	100%	1e-13	34.23%	NP_032652.3
pulmonary surfactant-associated protein D precursor [Mus musculus]	55.5	55.5	94%	1e-12	30.19%	NP_033186.1
macrophage mannose receptor 1 precursor [Mus musculus]	54.7	194	100%	3e-12	36.19%	NP_032651.2
L-selectin isoform 2 precursor [Mus musculus]	53.1	53.1	97%	1e-11	30.36%	NP_001157531.1
L-selectin isoform 1 precursor [Mus musculus]	52.8	52.8	97%	2e-11	30.36%	NP_035476.1
PREDICTED: L-selectin isoform X3 [Mus musculus]	52.8	52.8	97%	2e-11	30.36%	XP_006496781.1
C-type lectin domain family 3 member A precursor [Mus musculus]	51.6	51.6	98%	2e-11	26.85%	NP_001007224.1
PREDICTED: L-selectin isoform X2 [Mus musculus]	52.4	52.4	97%	2e-11	30.36%	XP_006496780.1
PREDICTED: L-selectin isoform X1 [Mus musculus]	52.4	52.4	97%	2e-11	30.36%	XP_006496779.1
brevican core protein isoform 1 precursor [Mus musculus]	49.7	49.7	100%	2e-10	26.13%	NP_031555.2
versican core protein isoform 1 precursor [Mus musculus]	49.3	49.3	99%	3e-10	28.93%	NP_001074718.1
PREDICTED: versican core protein isoform X1 [Mus musculus]	49.3	49.3	99%	3e-10	28.93%	XP_011242772.1
versican core protein isoform 3 precursor [Mus musculus]	48.9	48.9	99%	4e-10	28.93%	NP_001127946.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform F [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	5e-10	30.56%	NP_001240675.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform E [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	6e-10	30.56%	NP_001240674.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform A [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	6e-10	30.56%	NP_038545.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform B [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	6e-10	30.56%	NP_001240666.1
versican core protein isoform 2 precursor [Mus musculus]	48.1	48.1	99%	6e-10	28.93%	NP_062262.2
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform A precursor [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	7e-10	30.56%	NP_001240672.1
PREDICTED: low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform X1 [Mus musculus]	48.1	48.1	97%	7e-10	30.56%	XP_006508760.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform C [Mus musculus]	47.8	47.8	97%	7e-10	30.56%	NP_001240668.1
PREDICTED: versican core protein isoform X2 [Mus musculus]	48.1	48.1	99%	8e-10	28.93%	XP_011242773.1
low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor isoform G [Mus musculus]	47.8	47.8	97%	9e-10	30.56%	NP_001240676.1
mannose-binding protein C precursor [Mus musculus]	46.6	46.6	54%	2e-09	40.62%	NP_034906.1
versican core protein isoform 4 precursor [Mus musculus]	45.8	45.8	99%	4e-09	28.93%	NP_001127947.1
C-type lectin domain family 4 member K [Mus musculus]	44.7	44.7	98%	1e-08	27.03%	NP_659192.2
PREDICTED: collectin-10 isoform X1 [Mus musculus]	43.5	43.5	98%	2e-08	24.77%	XP_011243917.1
C-type lectin domain family 4 member G [Mus musculus]	43.5	43.5	43%	2e-08	44.90%	NP_083741.1
PREDICTED: C-type lectin domain family 4 member K isoform X1 [Mus musculus]	43.5	43.5	98%	3e-08	27.93%	XP_006506202.1
collectin-10 precursor [Mus musculus]	42.7	42.7	98%	4e-08	24.77%	NP_775598.2
lymphocyte antigen 75 precursor [Mus musculus]	41.6	41.6	97%	1e-07	29.63%	NP_038853.2
dendritic cell inhibitory receptor 3 [Mus musculus]	38.9	38.9	97%	9e-07	25.23%	NP_694877.2
secretory phospholipase A2 receptor precursor [Mus musculus]	38.1	38.1	94%	2e-06	28.57%	NP_032893.1
PREDICTED: secretory phospholipase A2 receptor isoform X1 [Mus musculus]	38.1	38.1	94%	2e-06	28.57%	XP_006498991.1
collectin-12 [Mus musculus]	35.8	35.8	60%	1e-05	35.71%	NP_569716.2
PREDICTED: collectin-12 isoform X1 [Mus musculus]	35.4	35.4	60%	2e-05	35.71%	XP_006525703.1
FRAS1-related extracellular matrix protein 1 isoform 2 precursor [Mus musculus]	33.9	33.9	99%	6e-05	25.00%	NP_001185740.1
FRAS1-related extracellular matrix protein 1 isoform 1 precursor [Mus musculus]	33.9	33.9	99%	7e-05	25.00%	NP_808531.2
PREDICTED: FRAS1-related extracellular matrix protein 1 isoform X2 [Mus musculus]	33.9	33.9	99%	7e-05	25.00%	XP_006538080.1
PREDICTED: FRAS1-related extracellular matrix protein 1 isoform X3 [Mus musculus]	33.5	33.5	99%	9e-05	25.00%	XP_006538081.1
PREDICTED: C-type lectin domain family 4, member b1 isoform X1 [Mus musculus]	32.0	32.0	98%	2e-04	24.55%	XP_006506633.1
C-type lectin domain family 4, member b1 isoform 1 [Mus musculus]	31.6	31.6	98%	3e-04	24.55%	NP_001177239.1
C-type lectin domain family 4, member b1 isoform 2 [Mus musculus]	31.6	31.6	98%	3e-04	24.55%	NP_081494.1

Figura A4: Búsqueda de genes con homología de secuencia para MdCTL1 en *M. musculus*. Se muestran los resultados obtenidos por BLAST de proteínas de *M. musculus* con E-valor bajo a partir de la secuencia de MdCTL1.

Bibliografía

1. Slack, J. and B.M. Arif, *The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function*. Adv Virus Res, 2007. **69**: p. 99-165.
2. Rohrmann, G.F., in *Baculovirus Molecular Biology: Third Edition*. 2013: Bethesda (MD).
3. Blissard, G.W. and D.A. Theilmann, *Baculovirus Entry and Egress from Insect Cells*. Annu Rev Virol, 2018. **5**(1): p. 113-139.
4. Fraser, M.J., *Ultrastructural observations of virion maturation in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus infected Spodoptera frugiperda cell cultures*. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res., 1986. **95**(1-3): p. 189-195.
5. Wang, R., et al., *Proteomics of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus budded virions*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7233-42.
6. Herniou, E.A. and J.A. Jehle, *Baculovirus phylogeny and evolution*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(10): p. 1043-50.
7. Theze, J., et al., *Biodiversity, Evolution and Ecological Specialization of Baculoviruses: A Treasure Trove for Future Applied Research*. Viruses, 2018. **10**(7).
8. Haase, S., A. Sciocco-Cap, and V. Romanowski, *Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives*. Viruses, 2015. **7**(5): p. 2230-67.
9. Sun, X., *History and current status of development and use of viral insecticides in China*. Viruses, 2015. **7**(1): p. 306-19.
10. van Oers, M.M., G.P. Pijlman, and J.M. Vlak, *Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology*. J Gen Virol, 2015. **96**(Pt 1): p. 6-23.
11. Irons, S.L., et al., *Protein Production Using the Baculovirus Expression System*. Curr Protoc Protein Sci, 2018. **91**: p. 5 5 1-5 5 22.
12. Makkonen, K.E., K. Airene, and S. Yla-Herttulala, *Baculovirus-mediated gene delivery and RNAi applications*. Viruses, 2015. **7**(4): p. 2099-125.
13. Mansouri, M. and P. Berger, *Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future*. Plasmid, 2018. **98**: p. 1-7.
14. Ono, C., et al., *Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy*. Viruses, 2018. **10**(9).
15. Whitt, M.A. and J.S. Manning, *A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body*. Virology, 1988. **163**(1): p. 33-42.
16. Gross, C.H., R.L. Russell, and G.F. Rohrmann, *Orgyia pseudotsugata baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 5): p. 1115-23.
17. Gombart, A.F., et al., *A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization*. Virology, 1989. **169**(1): p. 182-93.
18. Lee, S.Y., et al., *A common pathway for p10 and calyx proteins in progressive stages of polyhedron envelope assembly in AcMNPV-infected Spodoptera frugiperda larvae*. Arch Virol, 1996. **141**(7): p. 1247-58.
19. Yu, I.L., et al., *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewer nucleocapsids*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 6): p. 1499-504.
20. Ackermann, H.W. and W.A. Smirnov, *A morphological investigation of 23 baculoviruses*. Journal of Invertebrate Pathology, 1983. **41**(3): p. 269-280.
21. Garry, C.E. and R.F. Garry, *Proteomics computational analyses suggest that baculovirus GP64 superfamily proteins are class III penetrenes*. Virol J, 2008. **5**: p. 28.
22. Monsma, S.A., A.G. Oomens, and G.W. Blissard, *The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4607-16.
23. Oomens, A.G. and G.W. Blissard, *Requirement for GP64 to drive efficient budding of Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus*. Virology, 1999. **254**(2): p. 297-314.
24. Wang, Q., et al., *Budded baculovirus particle structure revisited*. J Invertebr Pathol, 2016. **134**: p. 15-22.
25. Dow, J.A., *pH GRADIENTS IN LEPIDOPTERAN MIDGUT*. J Exp Biol, 1992. **172**(Pt 1): p. 355-375.
26. Boogaard, B., M.M. van Oers, and J.W.M. van Lent, *An Advanced View on Baculovirus per Os Infectivity Factors*. Insects, 2018. **9**(3).
27. Horton, H.M. and J.P. Burand, *Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 1860-8.

28. Blissard, G.W. and J.R. Wenz, *Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6829-35.
29. Hefferon, K.L., et al., *Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry*. Virology, 1999. **258**(2): p. 455-68.
30. Dong, S. and G.W. Blissard, *Functional analysis of the Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus GP64 terminal fusion loops and interactions with membranes*. J Virol, 2012. **86**(18): p. 9617-28.
31. Long, G., et al., *Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8830-3.
32. Markovic, I., et al., *Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates*. J Cell Biol, 1998. **143**(5): p. 1155-66.
33. Au, S., et al., *A new mechanism for nuclear import by actin-based propulsion used by a baculovirus nucleocapsid*. J Cell Sci, 2016. **129**(15): p. 2905-11.
34. van Loo, N.D., et al., *Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 961-70.
35. Ohkawa, T., L.E. Volkman, and M.D. Welch, *Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface*. J Cell Biol, 2010. **190**(2): p. 187-95.
36. Granados, R.R. and K.A. Lawler, *In vivo pathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection*. Virology, 1981. **108**(2): p. 297-308.
37. Danquah, J.O., et al., *Direct interaction of baculovirus capsid proteins VP39 and EXON0 with kinesin-1 in insect cells determined by fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy*. J Virol, 2012. **86**(2): p. 844-53.
38. Braunagel, S.C. and M.D. Summers, *Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(10): p. 1084-95.
39. Inceoglu, A.B., S.G. Kamita, and B.D. Hammock, *Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook*. Adv Virus Res, 2006. **68**: p. 323-60.
40. Szweczyk, B., et al., *Baculoviruses-- re-emerging biopesticides*. Biotechnol Adv, 2006. **24**(2): p. 143-60.
41. Kost, T.A., J.P. Condeary, and D.L. Jarvis, *Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 567-75.
42. Chambers, A.C., et al., *Overview of the Baculovirus Expression System*. Curr Protoc Protein Sci, 2018. **91**: p. 5 4 1-5 4 6.
43. Summers, M.D., *Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides*. Adv Virus Res, 2006. **68**: p. 3-73.
44. Fainboim, G., *Introducción a la Inmunología Humana*. 6a edición ed. 2011: Editorial Médica Panamericana.
45. Thomas, R. and X. Yang, *NK-DC Crosstalk in Immunity to Microbial Infection*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 6374379.
46. Molgora, M., et al., *The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells*. Scand J Immunol, 2018. **88**(3): p. e12705.
47. Chen, Q., L. Sun, and Z.J. Chen, *Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing*. Nat Immunol, 2016. **17**(10): p. 1142-9.
48. Cheng, W.Y., et al., *The cGas-Sting Signaling Pathway Is Required for the Innate Immune Response Against Ectromelia Virus*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1297.
49. Li, S.F., et al., *Type I Interferons: Distinct Biological Activities and Current Applications for Viral Infection*. Cell Physiol Biochem, 2018. **51**(5): p. 2377-2396.
50. Negishi, H., T. Taniguchi, and H. Yanai, *The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(11).
51. Guzman, E. and M. Montoya, *Contributions of Farm Animals to Immunology*. Front Vet Sci, 2018. **5**: p. 307.
52. Summerfield, A., G. Auray, and M. Ricklin, *Comparative dendritic cell biology of veterinary mammals*. Annu Rev Anim Biosci, 2015. **3**: p. 533-57.
53. Auray, G., et al., *Characterization and Transcriptomic Analysis of Porcine Blood Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells Reveals Striking Species-Specific Differences*. J Immunol, 2016. **197**(12): p. 4791-4806.
54. Jungi, T.W., et al., *Toll-like receptors in domestic animals*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 107-20.

55. Talker, S.C., et al., *Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets*. Dev Comp Immunol, 2013. **40**(1): p. 51-68.
56. De Pelsmaeker, S., et al., *Porcine NK cells display features associated with antigen-presenting cells*. J Leukoc Biol, 2018. **103**(1): p. 129-140.
57. Yang, G., J.A. Richt, and J.P. Driver, *Harnessing Invariant NKT Cells to Improve Influenza Vaccines: A Pig Perspective*. Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
58. Takamatsu, H.H., et al., *Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **112**(1-2): p. 49-61.
59. Makkonen, K.E., et al., *6-o- and N-sulfated syndecan-1 promotes baculovirus binding and entry into Mammalian cells*. J Virol, 2013. **87**(20): p. 11148-59.
60. Wu, C. and S. Wang, *A pH-sensitive heparin-binding sequence from Baculovirus gp64 protein is important for binding to mammalian cells but not to Sf9 insect cells*. J Virol, 2012. **86**(1): p. 484-91.
61. Tani, H., et al., *Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection*. Virology, 2001. **279**(1): p. 343-53.
62. Kataoka, C., et al., *Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells*. J Virol, 2012. **86**(5): p. 2610-20.
63. Matilainen, H., et al., *Baculovirus entry into human hepatoma cells*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15452-9.
64. Salminen, M., et al., *Improvement in nuclear entry and transgene expression of baculoviruses by disintegration of microtubules in human hepatocytes*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2720-8.
65. Kukkonen, S.P., et al., *Baculovirus capsid display: a novel tool for transduction imaging*. Mol Ther, 2003. **8**(5): p. 853-62.
66. Mueller, J., et al., *Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion*. PLoS Biol, 2014. **12**(1): p. e1001765.
67. Fujita, R., et al., *Expression of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2390-5.
68. Volkman, L.E. and P.A. Goldsmith, *In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells*. Appl Environ Microbiol, 1983. **45**(3): p. 1085-93.
69. Makela, A.R., et al., *Occlusion-derived baculovirus: interaction with human cells and evaluation of the envelope protein P74 as a surface display platform*. J Biotechnol, 2008. **135**(2): p. 145-56.
70. Hervas-Stubbs, S., et al., *Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2361-9.
71. Hervas-Stubbs, S., et al., *Conventional but not plasmacytoid dendritic cells foster the systemic virus-induced type I IFN response needed for efficient CD8 T cell priming*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1151-61.
72. Abe, T., et al., *Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2847-58.
73. Abe, T., et al., *Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner*. J Virol, 2009. **83**(15): p. 7629-40.
74. Abe, T. and Y. Matsuura, *Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals*. Curr Gene Ther, 2010. **10**(3): p. 226-31.
75. Ono, C., et al., *Innate immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in mammalian cells*. J Virol, 2014. **88**(4): p. 2157-67.
76. Molinari, P., et al., *Baculovirus capsid display potentiates OVA cytotoxic and innate immune responses*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24108.
77. Moriyama, T., et al., *Baculovirus directly activates murine NK cells via TLR9*. Cancer Gene Ther, 2017. **24**(4): p. 175-179.
78. Heinimäki, S., et al., *Live baculovirus acts as a strong B and T cell adjuvant for monomeric and oligomeric protein antigens*. Virology, 2017. **511**: p. 114-122.
79. Hu, Y.C., *Baculoviral vectors for gene delivery: a review*. Curr Gene Ther, 2008. **8**(1): p. 54-65.
80. Hofmann, C., et al., *Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10099-103.
81. Boyce, F.M. and N.L. Bucher, *Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2348-52.

82. Kaikkonen, M.U., et al., *Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo*. *Gene Ther*, 2006. **13**(4): p. 304-12.
83. Lu, L., Y. Ho, and J. Kwang, *Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(4): p. 1178-83.
84. Park, S.W., et al., *Hepatocyte-specific gene expression by baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(2): p. 444-50.
85. Pieroni, L., D. Maione, and N. La Monica, *In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(8): p. 871-81.
86. Li, Y., et al., *Immunization with pseudotype baculovirus expressing envelope protein of Japanese encephalitis virus elicits protective immunity in mice*. *J Gene Med*, 2009. **11**(2): p. 150-9.
87. Huang, H., et al., *Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice*. *Arch Virol*, 2011. **156**(5): p. 753-8.
88. Tani, H., et al., [*Baculovirus vector--gene transfer into mammalian cells*]. *Uirusu*, 2003. **53**(2): p. 185-93.
89. Abe, T., et al., *Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice*. *J Immunol*, 2003. **171**(3): p. 1133-9.
90. Gronowski, A.M., et al., *Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells*. *J Virol*, 1999. **73**(12): p. 9944-51.
91. Niu, M., Y. Han, and W. Li, *Baculovirus up-regulates antiviral systems and induces protection against infectious bronchitis virus challenge in neonatal chicken*. *Int Immunopharmacol*, 2008. **8**(12): p. 1609-15.
92. Emran, T.B., et al., *Baculovirus-Induced Fast-Acting Innate Immunity Kills Liver-Stage Plasmodium*. *J Immunol*, 2018. **201**(8): p. 2441-2451.
93. Kitajima, M., et al., *Induction of Natural Killer Cell-dependent Antitumor Immunity by the Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus*. *Mol Ther*, 2008. **16**(2): p. 261-8.
94. Fujihira, A., et al., *Antitumor effects of baculovirus-infected dendritic cells against human pancreatic carcinoma*. *Gene Ther*, 2014. **21**(9): p. 849-54.
95. Suzuki, T., et al., *Baculovirus activates murine dendritic cells and induces non-specific NK cell and T cell immune responses*. *Cell Immunol*, 2010. **262**(1): p. 35-43.
96. Tami, C., et al., *Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells*. *Arch Virol*, 2000. **145**(9): p. 1815-28.
97. Tami, C., et al., *Immunological properties of FMDV-gP64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces*. *Vaccine*, 2004. **23**(6): p. 840-5.
98. Peralta, A., et al., *A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. **75**(2): p. 407-14.
99. Peralta, A., et al., *VPI protein of Foot-and-mouth disease virus (FMDV) impairs baculovirus surface display*. *Virus Res*, 2013. **175**(1): p. 87-90.
100. Tavarone, E., et al., *The localization of a heterologous displayed antigen in the baculovirus-budded virion determines the type and strength of induced adaptive immune response*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017. **101**(10): p. 4175-4184.
101. Premanand, B., P. Zhong Wee, and M. Prabakaran, *Baculovirus Surface Display of Immunogenic Proteins for Vaccine Development*. *Viruses*, 2018. **10**(6).
102. Chang, C.Y., et al., *Display of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein on Baculovirus to Improve Immunogenicity and Protective Efficacy*. *Viruses*, 2018. **10**(7).
103. Molinari, P., et al., *Baculovirus capsid display in vaccination schemes: effect of a previous immunity against the vector on the cytotoxic response to delivered antigens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018. **102**(23): p. 10139-10146.
104. (OIE), I.B.P.L.O.M.D.S.A.
105. Association, C.o.F.a.E.D.o.t.U.S.A.H., *Foreign Animal Diseases*. 7a edición ed. 2008.
106. de Los Santos, T., F. Diaz-San Segundo, and L.L. Rodriguez, *The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease*. *Curr Opin Virol*, 2018. **29**: p. 16-25.
107. Cao, Y., Z. Lu, and Z. Liu, *Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems*. *Expert Rev Vaccines*, 2016. **15**(6): p. 783-9.
108. Knight-Jones, T.J. and J. Rushton, *The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur?* *Prev Vet Med*, 2013. **112**(3-4): p. 161-73.

109. Jamal, S.M. and G.J. Belsham, *Foot-and-mouth disease: past, present and future*. Vet Res, 2013. **44**: p. 116.
110. Iqbal, M., et al., *Analysis of the Outcomes of Combined Cross-Linking with Intracorneal Ring Segment Implantation for the Treatment of Pediatric Keratoconus*. Curr Eye Res, 2019. **44**(2): p. 125-134.
111. Stenfeldt, C., et al., *The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs*. Front Vet Sci, 2016. **3**: p. 41.
112. Fukai, K., et al., *Dose-dependent responses of pigs infected with foot-and-mouth disease virus O/JPN/2010 by the intranasal and intraoral routes*. Arch Virol, 2015. **160**(1): p. 129-39.
113. Stenfeldt, C., et al., *Early events in the pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs; identification of oropharyngeal tonsils as sites of primary and sustained viral replication*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106859.
114. Diaz-San Segundo, F., et al., *Selective lymphocyte depletion during the early stage of the immune response to foot-and-mouth disease virus infection in swine*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2369-79.
115. Toka, F.N., et al., *Natural killer cell dysfunction during acute infection with foot-and-mouth disease virus*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(12): p. 1738-49.
116. Pacheco, J.M., et al., *IgA antibody response of swine to foot-and-mouth disease virus infection and vaccination*. Clin Vaccine Immunol, 2010. **17**(4): p. 550-8.
117. SENASA, I.B.P.
118. Orsel, K., et al., *Foot and mouth disease virus transmission among vaccinated pigs after exposure to virus shedding pigs*. Vaccine, 2007. **25**(34): p. 6381-91.
119. Parida, S., et al., *Reduction of foot-and-mouth disease (FMD) virus load in nasal excretions, saliva and exhaled air of vaccinated pigs following direct contact challenge*. Vaccine, 2007. **25**(45): p. 7806-17.
120. Golde, W.T., et al., *Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: Use in emergency outbreak response*. Vaccine, 2005. **23**(50): p. 5775-82.
121. Rigden, R.C., et al., *Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs*. Vaccine, 2003. **21**(13-14): p. 1466-77.
122. Daoud, H.M. and E.M. Soliman, *Evaluation of Spirulina platensis extract as natural antiviral against foot and mouth disease virus strains (A, O, SAT2)*. Vet World, 2015. **8**(10): p. 1260-5.
123. Younus, I., et al., *Evaluation of antiviral activity of plant extracts against foot and mouth disease virus in vitro*. Pak J Pharm Sci, 2016. **29**(4): p. 1263-8.
124. de Avila, A.I., et al., *Favipiravir can evoke lethal mutagenesis and extinction of foot-and-mouth disease virus*. Virus Res, 2017. **233**: p. 105-112.
125. Gu, C.J., et al., *An antiviral mechanism investigated with ribavirin as an RNA virus mutagen for foot-and-mouth disease virus*. J Biochem Mol Biol, 2006. **39**(1): p. 9-15.
126. Zeng, J., et al., *Ribavirin-resistant variants of foot-and-mouth disease virus: the effect of restricted quasispecies diversity on viral virulence*. J Virol, 2014. **88**(8): p. 4008-20.
127. Grubman, M.J., *Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals*. Biologicals, 2005. **33**(4): p. 227-34.
128. Dias, C.C., et al., *Porcine type I interferon rapidly protects swine against challenge with multiple serotypes of foot-and-mouth disease virus*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(2): p. 227-36.
129. Moraes, M.P., et al., *Enhanced antiviral activity against foot-and-mouth disease virus by a combination of type I and II porcine interferons*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7124-35.
130. Perez-Martin, E., et al., *Type III interferon protects swine against foot-and-mouth disease*. J Interferon Cytokine Res, 2014. **34**(10): p. 810-21.
131. Diaz-San Segundo, F., et al., *Interferon-induced protection against foot-and-mouth disease virus infection correlates with enhanced tissue-specific innate immune cell infiltration and interferon-stimulated gene expression*. J Virol, 2010. **84**(4): p. 2063-77.
132. Dias, C.C., et al., *Novel antiviral therapeutics to control foot-and-mouth disease*. J Interferon Cytokine Res, 2012. **32**(10): p. 462-73.
133. Ramirez-Carvajal, L., et al., *Constitutively Active IRF7/IRF3 Fusion Protein Completely Protects Swine against Foot-and-Mouth Disease*. J Virol, 2016. **90**(19): p. 8809-21.
134. Alves, M.P., et al., *Innate immune defenses induced by CpG do not promote vaccine-induced protection against foot-and-mouth disease virus in pigs*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(8): p. 1151-7.

135. Diaz-San Segundo, F., et al., *Venezuelan equine encephalitis replicon particles can induce rapid protection against foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 5447-60.
136. Toka, F.N., et al., *Activation of porcine natural killer cells and lysis of foot-and-mouth disease virus infected cells*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(3): p. 179-92.
137. Molinari, P., et al., *Baculovirus treatment fully protects mice against a lethal challenge of FMDV*. Antiviral Res, 2010. **87**(2): p. 276-9.
138. Quattrocchi, V., et al., *Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity*. Vaccine, 2013. **31**(24): p. 2713-8.
139. Chapman, W.G. and I.A. Ramshaw, *Growth of the IB-RS-2 pig kidney cell line in suspension culture and its susceptibility to foot-and-mouth disease virus*. Appl Microbiol, 1971. **22**(1): p. 1-5.
140. LaRocco, M., et al., *A continuous bovine kidney cell line constitutively expressing bovine alphavbeta6 integrin has increased susceptibility to foot-and-mouth disease virus*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(6): p. 1714-20.
141. LaRocco, M., et al., *Correction for LaRocco et al., A Continuous Bovine Kidney Cell Line Constitutively Expressing Bovine alphaVbeta6 Integrin Has Increased Susceptibility to Foot-and-Mouth Disease Virus*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(2): p. 755.
142. Guzylack-Piriou, L., et al., *Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12*. Immunology, 2004. **112**(1): p. 28-37.
143. Wikstrom, F.H., et al., *Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 4919-27.
144. Kamstrup, S., D. Verthelyi, and D.M. Klinman, *Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides*. Vet Microbiol, 2001. **78**(4): p. 353-62.
145. Van der Stede, Y., et al., *CpG-oligodinucleotides as an effective adjuvant in pigs for intramuscular immunizations*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **86**(1-2): p. 31-41.
146. O'Reilly, D.R., Miller, LK, Luckow, VA, *Baculovirus expression vectors. A laboratory manual*. 1994.
147. Reed, L. and H. Muench, *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. Am. J. Hyg., 1938. **27**: p. 493.
148. Hohmann, A.W. and P. Faulkner, *Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by Western blot analysis*. Virology, 1983. **125**(2): p. 432-44.
149. Chinsangaram, J., M. Koster, and M.J. Grubman, *Inhibition of L-deleted foot-and-mouth disease virus replication by alpha/beta interferon involves double-stranded RNA-dependent protein kinase*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5498-503.
150. Molina, G.N., et al., *Two Distinctive Phenotypes of AcMNPV Display Different Immune Abilities and Intracellular Destiny*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168939.
151. Zhou, J. and G.W. Blissard, *Mapping the conformational epitope of a neutralizing antibody (AcV1) directed against the AcMNPV GP64 protein*. Virology, 2006. **352**(2): p. 427-37.
152. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts, *The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6770-6.
153. Zhou, J., et al., *Identification and characterization of two novel C-type lectins from the larvae of housefly, Musca domestica L*. Arch Insect Biochem Physiol, 2018. **98**(3): p. e21467.
154. Werling, D., et al., *Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition*. Trends Immunol, 2009. **30**(3): p. 124-30.
155. Hervas-Stubbs, S., et al., *TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8+ T cells in the absence of CD4+ T-cell help*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5318-26.
156. Arase, H., et al., *Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2)*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1141-4.
157. Latz, E., et al., *Mechanisms of TLR9 activation*. J Endotoxin Res, 2004. **10**(6): p. 406-12.
158. Latz, E., et al., *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 190-8.
159. Leifer, C.A., et al., *TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1179-83.
160. Guiducci, C., et al., *Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1999-2008.

161. Moseman, A.P., et al., *Mannose receptor 1 mediates cellular uptake and endosomal delivery of CpG-motif containing oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5615-24.
162. Luo, W.Y., et al., *Adaptive immune responses elicited by baculovirus and impacts on subsequent transgene expression in vivo*. J Virol, 2013. **87**(9): p. 4965-73.
163. Argilaguet, J.M., et al., *BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus*. Antiviral Res, 2013. **98**(1): p. 61-5.
164. Liu, Z., et al., *Surface displaying of swine IgG1 Fc enhances baculovirus-vectored vaccine efficacy by facilitating viral complement escape and mammalian cell transduction*. Vet Res, 2017. **48**(1): p. 29.
165. Xu, X.G., et al., *Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: baculovirus virions displaying simultaneously GP5 glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2*. J Virol Methods, 2012. **179**(2): p. 359-66.
166. Xie, L., et al., *Molecular cloning and functional characterization of porcine stimulator of interferon genes (STING)*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(8): p. 847-54.
167. Summerfield, A., et al., *Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells*. Immunology, 2003. **110**(4): p. 440-9.
168. Gerner, W., T. Kaser, and A. Saalmuller, *Porcine T lymphocytes and NK cells--an update*. Dev Comp Immunol, 2009. **33**(3): p. 310-20.
169. Yao, Y., et al., *Membrane fusion activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G is induced by low pH but not by heat or denaturant*. Virology, 2003. **310**(2): p. 319-32.