



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE CRISTALES DE POLIEDRINA COMO VEHÍCULO PARA LA
EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN UN MODELO MURINO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JESÚS ZEPEDA CERVANTES

TUTOR PRINCIPAL

ALICIA SAMPIERI GARCÍA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-UNAM

COMITÉ TUTOR:

JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM

ROSALBA CARREÓN NÁPOLES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA-UNAM

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A Blanca Cervantes, quien ha sido mi padre y madre, a quien debo todos mis logros, a mis hijos Jesús y Christopher por compartir hermosos momentos, por enseñarme todos los días a vivir y a valorar el tiempo. A mi hermana Araceli de quien espero mucho.

A mis tías: la profesora Altagracia Cervantes y a la M. V. Z. Dolores Bravo por su apoyo incondicional, por hacerme comprender el significado de la familia, quienes han sido una guía en mi formación profesional.

A Filemón Zepeda mi padre y amigo, a mi abuela Guadalupe García y a mis tíos Juan e Ignacia a quienes aprecio mucho.

Quiero dedicar esta tesis y agradecer ampliamente a Abel Cervantes por brindarme su apoyo cuando más lo he necesitado, gran persona a quien admiro mucho.

En general a toda la familia Cervantes, que es muy valiosa para mí, principalmente a: Félix, Armando, Concepción, Gema, Guadalupe, Cristina y Mario. A los primos que nunca olvido, espero que siempre sigamos unidos. A mis compadres: Concepción Jara Cervantes y Alfredo Rodríguez.

A mis tíos: Elías y Lourdes Zayagos, a Moisés Ángel y a Javier Jara.

A mis amigos del Centro Escolar GVG, de la FMVZ-BUAP, de la FMVZ-UNAM y del Instituto de Fisiología Celular UNAM. ¡Goya!

Agradecimientos

A los miembros del jurado: Dr. Fernando Alba Hurtado (FMVZ-FES Cuautitlán, UNAM), Dra. Edda Lydia Sciutto Conde (IIB-UNAM), Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva (FMVZ-UNAM) por sus críticas y valiosos comentarios. A la M. en C. Alicia Sampieri García (IFC-UNAM), por su excelente papel como tutora y maestra, y al Dr. Luis Vaca Domínguez (IFC-UNAM) por su optimismo contagioso y por sus grandiosas aportaciones en este trabajo.

Al IFC: al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por su apoyo en cuestiones metodológicas y ayuda técnica con el uso de software y estadística.

A Arlet, Emma, Carlos, Jonathan y Kevin por compartir sus conocimientos y agradables momentos. A Adriana Balderas por su ayuda con el western blot. A la Sra. Salustia Salgado Guzmán por facilitarnos el material siempre en óptimas condiciones, además de ser buena persona, muchas gracias Doña Salus.

Al Dr. Fernando García Hernández de la unidad de microscopía; a la M. en C. Minerva Mora Cabrera de la unidad de biología molecular por su apoyo técnico; al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo por su ayuda con los equipos de cómputo.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, de la FMVZ-UNAM: al Dr. Iván Sánchez Betancourt y a la M. en C. Rosalba Carreón Nápoles quienes formaron parte de mi comité tutorial, por sus críticas y valiosos comentarios.

Al IIB: al Biól. Gonzalo Asariel Acero Galindo del departamento de inmunología, por su asistencia técnica en el ELISA, y a la M. en C. Jacquelyne Cervantes Torres por su apoyo técnico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca (No. de registro 282604). A los proyectos ICYTDF/200, 127822 CONACYT, 215122 (CARAMETECH), y 214836 (CARAMETECH).

Índice

RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
EL SISTEMA INMUNE	2
<i>Las células dendríticas inmaduras</i>	2
<i>Las células dendríticas maduras</i>	3
Los receptores tipo Toll.....	3
<i>Los linfocitos T cooperadores</i>	6
<i>Los linfocitos B</i>	7
Importancia de la producción de anticuerpos	7
<i>Los linfocitos T citotóxicos</i>	9
Importancia del efecto citotóxico	9
LAS VACUNAS: CLASIFICACIÓN GENERAL.....	11
<i>Las vacunas clásicas</i>	11
Las vacunas atenuadas.....	11
Las vacunas inactivadas.....	11
<i>Inconvenientes de las vacunas clásicas</i>	12
<i>Las vacunas de nueva generación: vacunas recombinantes</i>	12
Vacunas subunitarias y de péptidos.....	13
Partículas tipo virus.....	14
Vacunas de DNA.....	15
<i>Generalidades de los sistemas de expresión de antígenos recombinantes</i>	16
Sistema procariote	16
Sistema eucariote.....	17
<i>Limitantes de las vacunas de nueva generación</i>	30
LOS ADYUVANTES EN LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS	31
<i>Adyuvantes con licencia</i>	33
El hidróxido de aluminio	33
El monofosforil lípido A.....	33
Emulsiones	34
<i>Acarreadores y sistemas de entrega en desarrollo</i>	34
Baculovirus.....	34
Proteínas y péptidos adyuvantes	34
Micro y nanopartículas.....	35
<i>Adyuvantes de uso común en la investigación</i>	38
Los adyuvantes completo e incompleto de Freund	38
LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE COMO MODELO ANTIGÉNICO.....	39
JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	42

OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
CÉLULAS Y VIRUS.....	44
<i>Purificación viral</i>	45
<i>Titulación viral</i>	46
PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTÍGENOS	47
<i>Determinación de la cantidad de proteína y rendimiento</i>	47
SDS – PAGE Y WESTERN BLOT.....	48
<i>Determinación de la pureza de las micropartículas PH110GFP</i>	49
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, DE TRANSMISIÓN Y CONFOCAL.....	49
ASPECTOS ÉTICOS EN EL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	49
INMUNIZACIÓN DE LOS RATONES Y COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	50
PRUEBA DE TOXICIDAD Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL APLICANDO UNA SOLA DOSIS DE MICROPARTÍCULAS PH110GFP	52
ELISA INDIRECTO	52
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
RESULTADOS.....	54
EL PÉPTIDO DE 110 AA DE POLIEDRINA FORMA MICROPARTÍCULAS VERDES FLUORESCENTES CUANDO SE FUSIONA CON GFP ...	54
LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP SON FÁCILES DE PURIFICAR	55
DETECCIÓN DE GFP EN LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP	57
RENDIMIENTO DE LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP	58
LAS POLIEDRAS WT DIFIEREN DE LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP CON RESPECTO A SU MORFOLOGÍA	58
LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP NO CONTIENEN BACULOVIRUS OCLUIDOS	61
LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP PRODUCEN ANTICUERPOS ANTI-GFP DE LARGA DURACIÓN SIN LA ADMINISTRACIÓN DE ADYUVANTES.....	62
LAS MICROPARTÍCULAS PH110GFP PRODUCEN ALTOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-GFP SIN EL USO DE ADYUVANTES	63
LA APLICACIÓN DE ALTAS CANTIDADES DE MICROPARTÍCULAS PH110GFP NO MOSTRÓ TOXICIDAD, PERO MOSTRÓ UNA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS DOSIS-DEPENDIENTE	65
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	66
ABREVIATURAS	75
REFERENCIAS	78

Índice de figuras

Fig. 1. Procesamiento de los antígenos por las células presentadoras de antígenos (APCs) para la inducción de una respuesta inmune específica.	6
Fig. 2. Entrada del virus de pseudorabia mediante fusión de membranas..	8
Fig.3. Mecanismo apoptótico de los linfocitos T citotóxicos.....	10
Fig. 4. Representación esquemática de las rutas de glicosilación en células de insecto y de mamífero.....	27
Fig. 5. Clasificación generalizada de los adyuvantes.....	32
Fig. 6. Representación esquemática de la estructura de la GFP.....	39
Fig. 7. Gen de poliedrina de los baculovirus recombinantes y WT utilizados en este estudio	45
Fig. 8. Existen micropartículas verdes fluorescentes en el núcleo de las células infectadas con baculovirus PH110GFP	54
Fig. 9. Las estructuras PH110GFP son partículas tipo poliedra que contienen la GFP distribuida en toda la partícula.....	55
Fig. 10. Determinación de la pureza y peso molecular de las micropartículas PH110GFP por medio de un electroferograma utilizando un bioanalizador.	56
Fig. 11. Determinación de la pureza y peso molecular de las micropartículas PH110GFP por medio de SDS-PAGE	57

Fig. 12. Detección de GFP en sobrenadante de células infectadas con el baculovirus GFPs y en las micropartículas PH110GFP	58
Fig. 13. Poliedras WT observadas por microscopía electrónica de barrido	59
Fig. 14. Micropartículas PH110GFP observadas por microscopía electrónica de barrido.....	60
Fig. 15. Micropartículas PH110GFP analizadas por microscopía electrónica de transmisión.....	61
Fig. 16. Poliedras WT analizadas por microscopía electrónica de transmisión	61
Fig. 17. Esquema de inmunización de los ratones.....	62
Fig. 18. Evaluación del efecto adyuvante y duración de la respuesta humoral de ratones inmunizados con las micropartículas PH110GFP	63
Fig. 19. Las micropartículas PH110GFP producen altos títulos de anticuerpos anti-GFP sin el uso de adyuvantes	64
Fig. 20. Evaluación de la respuesta inmune humoral producida por una sola aplicación de micropartículas PH110GFP.	65

Índice de tablas

Tabla. 1. Proteínas adaptadoras involucradas en las vías de señalización de los TLRs.	5
Tabla 2. Esquema de vacunación de los grupos experimentales de ratones.	51

Resumen

Las vacunas tradicionales se basan en patógenos completos atenuados o inactivados, o sus toxinas. A través de estos componentes, se ha logrado disminuir drásticamente la incidencia y morbilidad de un gran número de enfermedades infecciosas, e incluso su erradicación, pero los procedimientos actuales no han resultado eficientes para otras enfermedades. Las nuevas vacunas llamadas “subunitarias” representan una alternativa para mejorar las vacunas actuales. Sin embargo, el uso de algunos componentes del patógeno generalmente induce una menor protección en comparación con la inmunización con el patógeno completo, y frecuentemente se requiere del uso de inmunopotenciadores que promuevan la eficiencia y duración de la respuesta inmune inducida. La baja eficiencia general de las vacunas subunitarias y los nuevos conocimientos en inmunidad innata han impulsado la búsqueda de nuevos inmunopotenciadores. En este trabajo se evaluó en ratones, el efecto adyuvante de un péptido de 110 aminoácidos de poliedrina (proteína de baculovirus) utilizando la proteína verde fluorescente (GFP) como antígeno. La GFP fusionada al fragmento de poliedrina (PH110GFP) se aplicó con y sin adyuvante de Freund (AF), utilizando como control la GFP soluble (GFPs). Los ratones inmunizados con PH110GFP produjeron una respuesta de IgG anti-GFP estadísticamente mayor que los ratones inmunizados con GFPs, y de similar magnitud y duración que los ratones inmunizados con GFPs con AF. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran el potencial de la poliedrina como adyuvante, que es similar al inducido con AF. Estos resultados aunados a la ausencia de efectos colaterales locales asociados a la inmunización señalan el potencial de la poliedrina como un nuevo adyuvante de interés para el aumento de la eficiencia de vacunas subunitarias, en particular aquellas cuya protección está fundamentalmente mediada por anticuerpos.

Palabras clave: Baculovirus, Poliedrina, Inmunoglobulina G, Inmunopotenciadores, ELISA.

Abstract

Traditional vaccines are based on whole attenuated or inactivated pathogens, or their toxins. Through these components, have been achieved dramatically decrease the incidence and morbidity of a large number of infectious diseases, and even eradication, but the current procedures have not been effective for other diseases. New vaccines called “subunit” represent an alternative to improve current vaccines. However, the use of some pathogen components generally induce lower protection compared to whole pathogen immunization, and often requires the use of immunopotentiators to promote efficiency and duration of the acquired immune response. The low overall efficiency of the subunit vaccines and new knowledge of innate immunity have prompted the research for new immunopotentiators. In this work the adjuvant effect of a 110 amino acids polyhedrin peptide (baculovirus protein) was evaluated in mice, using the green fluorescent protein (GFP) as antigen. The GFP fused to polyhedrin fragment (PH110GFP) was applied with and without Freund’s adjuvant (FA), using soluble GFP (GFPs) as control. Mice immunized with PH110GFP produced an IgG anti-GFP response statistically higher than mice immunized with GFPs, and similar magnitude and duration than mice immunized with GFPs with FA. The results obtained in this thesis demonstrate the potential of polyhedrin as adjuvant, being similar to the response induced with AF. This coupled with the lack of local side effects associated with immunization indicate the potential adjuvant effect of polyhedrin as a new adjuvant for increasing the efficiency of subunit vaccines, particularly those whose protection is mainly mediated by antibodies.

Keywords: Baculovirus, Polyhedrin, Immunoglobulin G, Immunopotentiators, ELISA.

Introducción

El desarrollo de vacunas ha sido una de las contribuciones más importantes de la inmunología para la salud pública y la medicina. Inició aproximadamente hace 200 años con Jenner, a través de la inoculación de viruelas de ganado bovino (vacuno) en personas; lo que afortunadamente producía una protección cruzada contra la viruela humana. Cien años más tarde los experimentos de Pasteur consolidaron estos conocimientos a través de la vacuna de la rabia, basada en la atenuación de dicho patógeno. Esto le abrió el camino al desarrollo de una serie completa de vacunas virales. Estas vacunas “antiguas” o convencionales se basan en el agente completo causante de la enfermedad y consiste en el agente “vivo” atenuado, o “muerto”, que son capaces de producir inmunidad protectora. Las vacunas actuales se han utilizado en la erradicación de enfermedades o bien, para disminuir drásticamente su incidencia (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

El objetivo de la vacunación es la inducción de una respuesta inmune específica, donde tradicionalmente se aplican patógenos atenuados o inactivados que exacerben la inmunidad sin causar enfermedad. Dependiendo del patógeno en cuestión, los componentes del sistema inmune tienen particular importancia en la protección contra dicho patógeno. Así, en el caso de toxinas, claramente se ha establecido la importancia de la respuesta basada en anticuerpos, cuya función es bloquear estos productos e impedir sus efectos. Mientras tanto, en el caso de otros patógenos como algunas infecciones virales también el incremento de la respuesta citotóxica resulta ser fundamental en la protección (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). En el caso de muchos otros patógenos se intenta incrementar la inmunidad contra estos, aunque sigue sin conocerse con precisión la relevancia de los diferentes componentes inmunes en la capacidad protectora. Es importante realizar una breve revisión del sistema inmune con respecto al procesamiento de los antígenos y la inducción de la respuesta inmune específica.

El sistema inmune

La inmunidad se refiere a la capacidad global del organismo de resistir las infecciones. La inmunidad tiene diferentes componentes que pueden ser divididos en aquellos relacionados con la inmunidad innata (natural o resistencia innata) y aquellos relacionados con la inmunidad adaptativa (adquirida) (Hoebe *et al.*, 2004). La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa durante una infección, y aunque no es específica para algún microorganismo determinado, inmediatamente esta disponible para combatir una amplia gama de agentes patógenos. La inmunidad innata es un precursor necesario de la inmunidad adaptativa, por lo tanto juega un rol crucial en el reconocimiento temprano del patógeno, y esta mediada por fagocitos, que son células presentadoras de antígenos (APCs) que tienen la capacidad de ingerir y degradar patógenos. Las APCs pueden ser células dendríticas (DCs), macrófagos y células B, que disparan una respuesta basada en citocinas (Akira *et al.*, 2006; Mogensen, 2009; Norton *et al.*, 2010). Las DCs sirven de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (McKenna *et al.*, 2005; Mogensen, 2009; Norton *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, las DCs expresan moléculas coestimuladoras esenciales para la activación de las células T y pueden inducir la diferenciación de células CD4⁺ en células T cooperadoras tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2). La inmunidad adaptativa es responsable de la eliminación del patógeno en la fase tardía de la infección, es de tipo específico y se encarga de la generación de memoria inmunológica, donde participan las células plasmáticas productoras de anticuerpos y las células T citotóxicas (CTLs) (Akira *et al.*, 2006; Mogensen, 2009).

Las células dendríticas inmaduras

Las DCs inmaduras residen en tejidos y actúan como centinelas, diferenciando los antígenos propios de los extraños. La función de las DCs en la inmunidad innata es reconocer patógenos extraños y dar “señales de peligro” para

iniciar una respuesta inmune adaptativa (Babensee, 2008). Durante la inmunidad innata, las DCs inmaduras reconocen componentes extraños como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) derivados de virus o microbios a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Akira *et al.*, 2006; Norton *et al.*, 2010).

Las células dendríticas maduras

El proceso de reconocimiento de los antígenos a través de la señalización de PRRs resulta en la maduración de las DCs anunciado por la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de forma estable y elevada y moléculas coestimuladoras, que permiten la presentación eficiente del antígeno y la capacidad estimuladora de los linfocitos T. Dicho proceso también puede ser disparado en presencia de indicadores endógenos de daño tisular y estrés celular (Norton *et al.*, 2010).

La maduración de las DCs, es un proceso continuo, que resulta en una mayor producción de citocinas como IL-12 que facilita la activación de linfocitos B y T, e inicia la inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica. Las DCs también son fundamentales en la auto-tolerancia inmunológica por inducir activamente la formación de linfocitos T reguladores. Por lo tanto, las DCs son responsables tanto de la inmunidad efectiva como de la tolerancia inmunológica (Liu, 2001; Mellman y Steinman, 2001; Kou *et al.*, 2011).

Los receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLRs) son proteínas transmembranales presentes en macrófagos y DCs principalmente (Szatmary, 2012). Los TLRs son prototipos de PRRs que pueden reconocer PAMPs (como bacterias, virus, hongos o

protozoarios) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (como ligandos endógenos en ausencia de infección), por lo que pueden iniciar la inflamación como respuesta a señales de alarma en una infección o en daño tisular respectivamente (Akira *et al.*, 2006; Szatmary, 2012; O'Neill *et al.*, 2013). La ausencia de la señalización de TLRs puede producir una alta susceptibilidad en los individuos expuestos a patógenos, pero la excesiva activación de los TLRs puede resultar en un efecto patogénico en vez de protector (Szatmary, 2012; Sabouri *et al.*, 2014).

Señalización de los TLRs

Los TLRs comparten una proteína en su región citoplásmica conocida como receptor de interleucina 1 (TIR) que interviene en la asociación entre TLRs y proteínas adaptadoras como: el factor 88 de diferenciación mieloide (Myd88), la proteína adaptadora con dominio TIR (TIRAP) o adaptador tipo Myd88 (Mal), el adaptador con un dominio TIR inductor de interferón β (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM). Se piensa que en la oligomerización de los TLRs inducida por su ligando se produce un cambio conformacional en el dominio citoplásmico de TIR que permite el reclutamiento de proteínas adaptadoras citoplásmicas y la subsecuente participación de moléculas de señalización (Szatmary, 2012).

Función de los TLRs

Existen 11 miembros de la familia de los TLRs, pero los más conocidos son 9. Los TLRs 1, 2, 4 y 6 reconocen principalmente la pared celular de bacterias y hongos como lipopolisacáridos (LPS) y lipopéptidos, el LTR5 se une a flagelinas, y los TLRs 3, 7, 8 y 9 reconocen estructuras de ácido nucleico que sirven como señales moleculares para infecciones virales. Consistentemente con la función de

reconocimiento de patógenos, los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie de la línea mieloide, mientras que los TLRs 3, 7, 8 y 9 se localizan en membranas endosoma/lisosoma, una localización más disponible para el reconocimiento de virus (Szatmary, 2012). Las DCs responden a virus de RNA secretando IFN tipo I (IFN α o β) vía TLR3 (Kawai y Akira, 2005).

El reconocimiento de PAMPs por PRRs como los TLRs dispara una señalización intracelular que culmina en la inducción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas e interferón tipo I y maduración de las DCs, lo que lleva a la activación de la inmunidad adaptativa (Kawai y Akira, 2005). Los TLRs más estudiados se mencionan en la Tabla 1.

Tabla. 1. Proteínas adaptadoras involucradas en las vías de señalización de los TLRs (Modificado de Szatmary, 2012).

Receptor	TLR1/TLR2	TLR2/TLR6	TLR3	TLR4	TLR5	TLR7	TLR8	TLR9
Ligandos	Triacil-lipopéptidos	Diacil-lipopéptidos	dsRNA	LPS	Flagelin	ssRNA	ssRNA	CpG DNA
MyD88	+	+	-	+	+	+	+	+
Mal/TIRAP	+	+	-	+	-	-	-	-
TRIF	-	-	+	+	-	-	-	-
TRAM	-	-	-	+	-	-	-	-

Los TLRs importantes en infecciones bacterianas son TLR1, TLR2 TLR4, TLR5 y TLR6, mientras en las infecciones virales, los más importantes son TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. La tabla muestra los receptores, sus ligandos, así como las proteínas adaptadoras relacionadas con su señalización.

Finalmente, los TLRs son importantes para la maduración de las DCs, aunque se ha reportado maduración en DCs deficientes de señalización de TLRs y por lo tanto, los TLRs no son los únicos involucrados en la maduración de DCs, y existen otros mecanismos independientes de la señalización de TLRs (Lopez *et al.*, 2004; Yount *et al.*, 2006).

Los linfocitos T cooperadores

Las DCs son las APCs más potentes debido a su capacidad extraordinaria para estimular linfocitos T precursores (Th0 o CD4⁺ vírgenes) (Liu, 2001; Mellman y Steinman, 2001; Norton *et al.*, 2010). Los Th0 maduran y se convierten en T cooperadores (Th o CD4⁺); donde se encuentran 2 subconjuntos: Th-1 y Th-2. Las citocinas secretadas por los linfocitos T juegan un papel fundamental en la iniciación y mantenimiento de la respuesta antiviral. Los Th-1 producen principalmente IL-2 e IFN γ y estimulan respuestas de CTLs y linfocitos B, mientras la IL-4 e IL-10 promueven principalmente la actividad de linfocitos B. Se cree que los Th-1 limitan la replicación viral en infecciones con herpesvirus (Pomorska-Mól y Markowska-Daniel, 2010). El proceso inmunológico del procesamiento de los antígenos e inducción de la respuesta inmune específica se resume en la Figura 1.

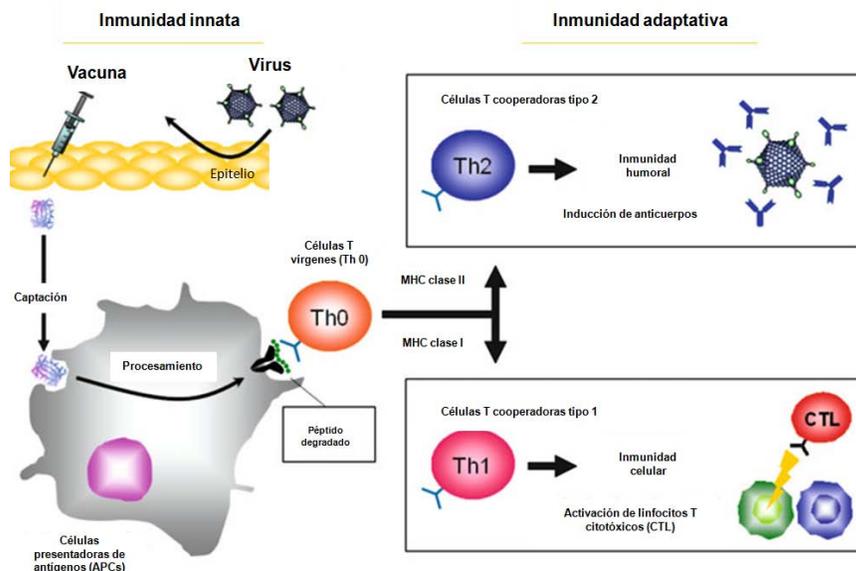


Fig. 1. Procesamiento de los antígenos por las células presentadoras de antígenos (APCs) para la inducción de una respuesta inmune específica. Los antígenos son procesados por las APCs y el péptido degradado es presentado a los linfocitos T precursores (Th0) para su maduración y diferenciación (Th1 o Th2). La inmunidad específica se basa en la inducción de una respuesta humoral y/o celular (Modificado de Akagi *et al.* 2012).

Los linfocitos B

Para la producción de anticuerpos (Igs) contra patógenos infecciosos es fundamental la diferenciación final de los linfocitos B en células plasmáticas (PCs) de respuesta humoral de larga duración. Las PCs se generan en respuesta a la interacción entre antígenos específicos para linfocitos B, TCD4⁺ y DCs; y secretan anticuerpos continuamente después de su formación en respuesta a la exposición a dicho antígeno. Hay dos categorías de antígenos que pueden activar y promover la diferenciación de linfocitos B: los antígenos dependientes de linfocitos T y los independientes, donde participan receptores de linfocitos T o B, respectivamente. Los linfocitos B al madurar, tienden a convertirse en plasmoblastos de baja afinidad de corta vida, que secretan predominantemente IgM que proveen una protección inicial y también conducen a la formación de los centros germinales, estructuras especializadas en los folículos de tejidos linfoides secundarios, donde los linfocitos B se someten a una hipermutación somática de los genes de la región variable de las Igs, y solo son seleccionados aquellos de alta afinidad para luego diferenciarse en linfocitos B de memoria de larga vida o PCs, capaces de secretar una variedad de isotipos de Igs, incluyendo el cambio (switch) a los isotipos IgG, IgA e IgE (Moens y Tangye, 2014).

Importancia de la producción de anticuerpos

El éxito de la mayoría de vacunas disponibles en la actualidad, se fundamenta en la producción eficiente de anticuerpos específicos contra un determinado antígeno a través de la activación de los linfocitos B (Moens y Tangye, 2014). Algunas infecciones virales se pueden prevenir principalmente por la respuesta humoral como en el caso de la infección por parvovirus porcino que causa abortos en cerdas. De hecho se piensa que la generación de una buena inmunidad previa a la gestación de las cerdas puede prevenir la infección de parvovirus, e incluso generalmente se piensa que la inmunidad adquirida contra

parvovirus resultará en un futuro en una protección de por vida contra la enfermedad clínica (Chen *et al.*, 2011). Otro ejemplo es el caso de influenza A, donde los anticuerpos dirigidos contra su hemaglutinina (HA), son capaces de adherirse al virus, disminuyendo su infectividad; éste proceso se llama neutralización (Edwards y Dimmock, 2001).

En la infección por el virus de pseudorabia, un virus de cerdo altamente letal, la respuesta humoral también es muy importante. Este virus entra por fusión de membranas, donde las glicoproteínas gC, gD y gB participan en: la adhesión al heparán sulfato, la unión con el receptor celular y la fusión de la envoltura viral con el citoplasma celular, respectivamente. Los anticuerpos dirigidos contra dichas glicoproteínas son capaces de neutralizar la infección de pseudorabia al impedir la fusión de membranas (Pomeranz *et al.* 2005) (Fig. 2).

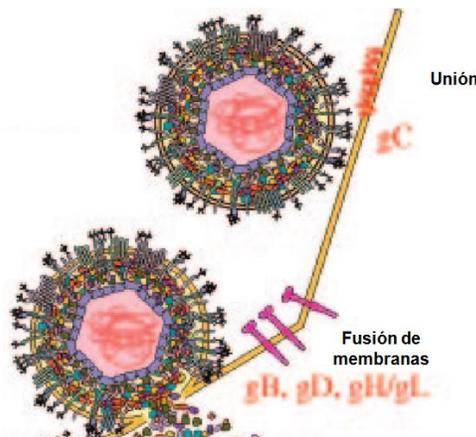


Fig. 2. Entrada del virus de pseudorabia mediante fusión de membranas. Antes de la fusión de membranas, el virus de pseudorabia necesita unirse al heparán sulfato, presente en la matriz extracelular por medio de gC. La fusión está dada por gB y gD principalmente (Modificado de Pomeranz *et al.*, 2005).

Los linfocitos T citotóxicos

Cuando las DCs maduran, son capaces de migrar a los nódulos linfáticos y estimular la activación de linfocitos T precursores para una respuesta antígeno-específica. Los antígenos que no tienen acceso a las DCs son ignorados por los linfocitos T (Lanzavecchia y Sallusto, 2001; Norton *et al.*, 2010). Las DCs también pueden controlar una parte sustancial de la respuesta inmune adaptativa mediante internalización y procesamiento de los antígenos a través del MHC clase I y II, presentando los péptidos antigénicos a T CD4⁺ y CD8⁺; estos últimos lisan las células huésped que han sido infectadas con un patógeno intracelular (Akagi *et al.*, 2012; Mellman y Steinman, 2001).

Importancia del efecto citotóxico

El mecanismo de acción de los CD8⁺, es a través de la formación de un poro por medio de una proteína altamente tóxica llamada perforina, para eliminar células “peligrosas”. Esta proteína se exporta a retículo endoplásmico, y después de la exocitosis, distribuye la proteasa proapoptótica llamada granzima, dentro de la célula diana mediante la interrupción de la membrana plasmática (López *et al.*, 2012) (Fig. 3). Otro aspecto importante para el correcto funcionamiento de los linfocitos T es la expresión de la glicoproteína CD28, que sirve para mediar la adhesión de linfocitos T con las APCs. CD28 proporciona una señal que puede ser sinérgica para estimular el receptor de antígenos de los linfocitos T promoviendo la proliferación de éstos y la secreción de citocinas (Harding *et al.*, 1992).

Como se mencionó previamente, en enfermedades como pseudorabia, la respuesta humoral es de gran importancia. Sin embargo, los altos títulos de anticuerpos circulantes no son los únicos responsables de la inmunidad protectora, ya que la inmunidad mediada por células, particularmente CTLs, es un mecanismo importante contra la infección (Yoon *et al.*, 2006).

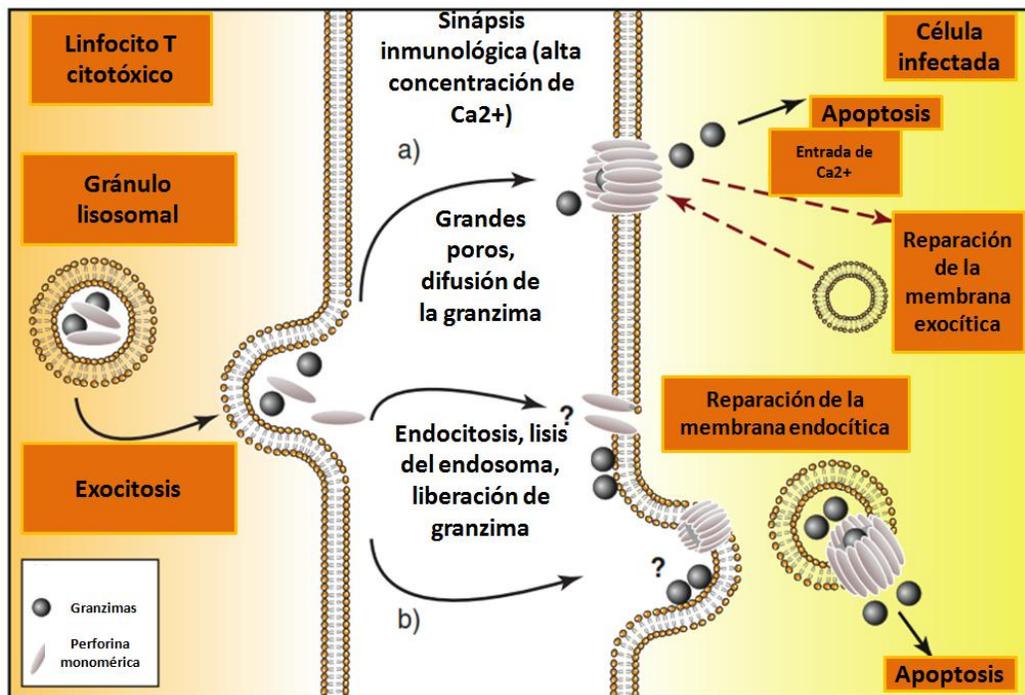


Fig.3. Mecanismo apoptótico de los linfocitos T citotóxicos: A) Formación de poros en la membrana de la célula infectada permitiendo la difusión de granzimas al citosol. El calcio dispara la reparación de la membrana celular, protegiéndola de la citólisis. B) La perforina interrumpe la membrana celular desencadenando su reparación, facilitando la entrada de granzimas y perforinas en el compartimento endocítico, seguido por la lisis del lisosoma y la liberación de las granzimas en el citosol (López *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior, el conocimiento de los componentes inmunológicos puede asistir en el diseño de vacunas.

Las vacunas: clasificación general

Las vacunas clásicas

Las vacunas basadas en cultivos de células de mamífero han sido de gran importancia para la salud humana y animal, y se han realizado esfuerzos para mejorar la producción de vacunas más efectivas (Noe *et al.*, 1994).

Las vacunas atenuadas

Los virus atenuados se producen por selección de mutantes naturales, o bien, por pases seriados para producir partículas defectuosas interferentes (DIPs) (Arnon y Ben-Yedidia, 2003; Rodríguez-Calvo *et al.*, 2010). Los pases virales se realizan sin diluir y frecuentemente resultan en un incremento en la producción de DIPs debido a que los virus con genomas más pequeños se replican más rápido, por lo que monopolizan la maquinaria de replicación viral interfiriendo con la producción de proteínas de los virus con genoma de longitud normal. Las DIPs contienen un genoma viral incompleto que únicamente se replica en co-infección con un virus estándar, pero tienen la capacidad de hacer madurar a las DCs (Yount *et al.*, 2006). Las vacunas atenuadas son bien toleradas e inmunogénicas, pero aunque son eficaces, su margen de seguridad es aún de gran preocupación (Arnon y Ben-Yedidia 2003; Bhanuprakash *et al.*, 2009).

Las vacunas inactivadas

Para la inactivación de virus se utilizan sustancias químicas, principalmente el formaldehído, a una concentración final de 1:4000 de la presentación comercial al 37%. La eficiencia en la inactivación depende de variables como: cepa, tipo de medio, presencia o ausencia de suero, pH, temperatura, tiempo de acción de los

químicos utilizados y concentración. Timm *et al.* (1956) postularon que en la inactivación viral utilizando formalina, se da un proceso de adsorción rápida de esta sustancia al virus. El complejo virus – formalina o las partículas ligeramente dañadas, pueden producir un retraso en la citopatogenicidad viral, y esto puede contribuir grandiosamente a la caída del título inicial.

Inconvenientes de las vacunas clásicas

La reversión de una cepa vacunal atenuada o la inactivación incompleta de los virus puede conducir al desarrollo de la enfermedad en individuos vacunados (Bhanuprakash *et al.*, 2009; revisado por Noad y Roy, 2003). Otra desventaja de estas vacunas es el intercambio genético, que frecuentemente ocurre en los virus de genoma segmentado (revisado por Noad y Roy, 2003; Pena *et al.*, 2013).

Por otro lado, existe una larga lista de patógenos para los que aun no se han logrado desarrollar vacunas utilizando las estrategias de las vacunas clásicas, dado que algunos patógenos no pueden ser cultivados *in vitro*, o que no se puede obtener el material suficiente para la producción de vacunas, como en el caso de parásitos. En el proceso de preparación de las vacunas, resulta difícil acertar adecuadamente cuando el patógeno ya ha sido atenuado o inactivado eficientemente (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). Esta consideración tiene particulares consecuencias en el caso de enfermedades incurables que llegan a ser fatales, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas a las vacunas tradicionales.

Las vacunas de nueva generación: vacunas recombinantes

Muchas vacunas en desarrollo utilizan avances tecnológicos como modificaciones genéticas y vectores recombinantes (Izurieta *et al.*, 2013). Además

el desarrollo continuo de vacunas es obligatorio debido a las variaciones genéticas de los virus, que tienen repercusión en sus componentes antigénicos, por lo que el mejoramiento y desarrollo de vacunas, no están basados en los organismos completos, sino mas bien en la producción de antígenos con potencial protector, que puedan ser sintetizados en bacterias, hongos, plantas o células animales, o mediante el uso de otros vectores, apropiados para la expresión de dichos antígenos, así como el uso de vacunas de DNA desnudo que contienen los genes de los microorganismos utilizando la tecnología de DNA recombinante (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

Actualmente existen vacunas en uso basadas en la tecnología de DNA recombinante y que han mostrado producir una respuesta inmune efectiva (Cox y Hollislyter, 2009). En contraste, tomando en cuenta las variaciones antigénicas de los patógenos, provocadas por mutaciones, que resultan en la evolución de nuevas cepas con diferente especificidad serológica, es obligatorio el desarrollo continuo de nuevas vacunas (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

Vacunas subunitarias y de péptidos

La inmunidad tanto humoral como celular, reconoce y reacciona con regiones específicas del patógeno. Así se han identificado los componentes más inmunogénicos de un patógeno con el propósito de diseñar vacunas utilizando estos componentes, en el intento de incrementar la eficiencia de la respuesta inmune inducida. Esta característica ha conducido al diseño de vacunas basadas en las subunidades del patógeno. Es preferible inmunizar con una proteína recombinante que presenta la parte inmunogénica del patógeno, evitando la aplicación del patógeno completo y riesgoso que pueda recombinar o revertir a un estado virulento (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). Estos péptidos se diseñan o se seleccionan en general con base a los epitopos o mimotopos identificados en antígenos protectores contra diferentes patógenos (Villa-Mancera *et al.*, 2014).

Esto permite la inmunización con una estructura mínima, que consiste en un antígeno bien definido que puede ser completamente caracterizado con respecto a su antigenicidad y a su inmunogenicidad para estimular una respuesta inmune específica y efectiva, evitando efectos potenciales indeseables como la respuesta contra antígenos somáticos, lo que resulta en una vacuna más segura y con los menores efectos secundarios posibles (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

Sin embargo se ha visto que estas vacunas no son tan efectivas debido a que la variación natural del epitopo prevendría la falta de inmunidad contra el patógeno, pero esto se puede mejorar con vacunas que contengan varios epitopos. La vacuna ideal basada en péptidos debe contener tanto epitopos para linfocitos B, como epitopos de linfocitos T que servirán para inducir respuestas Th y CTL. Una de las formas para mejorar el efecto protector de la vacuna basada en péptidos es refinar su afinidad hacia moléculas MHC clase I (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). En adición se ha visto que estos péptidos presentados en forma de partícula producen una inmunidad más efectiva que de manera soluble (Harding y Song, 1994).

Partículas tipo virus

Las partículas tipo virus (VLPs) mimetizan la estructura global de la partícula viral, las proteínas de la cápside tienen una conformación auténtica como la que se observa en vacunas de virus atenuados o inactivados; asemejándose a los viriones tanto en su morfología como en su inmunogenicidad. Las VLPs no contienen material genético y no se replican, por lo que no son infecciosas y no tienen los inconvenientes de reversión, recombinación o rearme (Gheysen *et al.*, 1989; Revisado por Noad y Roy, 2003).

Las VLPs han mostrado ser altamente efectivas al estimular la respuesta inmune mediada por linfocitos B, así como respuestas proliferativas de CD4⁺ y CD8⁺, que les proporciona una mayor contribución en cuanto a efectividad. Las

VLPs se han producido para más de 30 virus que infectan humanos y animales, incluyendo virus que contienen una o múltiples proteínas en la cápside, y aquellos con o sin envoltura lipídica. Hasta el momento, estas partículas no parecen estar limitadas a algún tipo o familia viral, ni por la complejidad de dicha partícula (Revisado por Noad y Roy, 2003).

Vacunas de DNA

Los avances más recientes en el desarrollo de vacunas involucran la administración directa del plásmido de DNA que codifica para los antígenos vacunales, en tejidos capaces de tomar el DNA y expresar el antígeno que permitirá una respuesta inmune efectiva. La aplicación de estas vacunas incluye la vía intramuscular (IM) y la aplicación en la epidermis. Utilizando ambos métodos, la respuesta inmune contra el antígeno persiste cerca de 1 mes. En ratones, la inmunización con DNA es comparable o superior a la aplicación de vacunas basadas en virus completos, tanto en respuesta humoral como celular. Sin embargo, falta por perfeccionar tanto la inmunogenicidad de las vacunas de DNA, como vigorizar la expresión de los genes que son incluidos en el plásmido de DNA. El nivel de protección de este sistema ha ido mejorando, la primera vacuna multigénica de DNA comenzó en el 2000 en las fases I y IIa al evaluar la seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad y eficacia protectora (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

En contraste, las vacunas de nueva generación, son seguras y eficaces de forma experimental, aunque necesitan ser evaluadas en campo a gran escala (Bhanuprakash *et al.*, 2009).

Generalidades de los sistemas de expresión de antígenos recombinantes

Las vacunas recombinantes necesitan ser producidas en un sistema de expresión seguro, en el que sea factible su producción a gran escala (Revisado por Noad y Roy, 2003).

Los antígenos recombinantes pueden obtenerse de sistemas de expresión procariotes como bacterias, o bien de sistemas eucariotes como células de mamífero, insectos, plantas o levaduras (Yusibov y Ravindrana, 2008; Yusibov *et al.*, 2011). Los primeros trabajos sobre producción de vacunas de subunidades se llevaron a cabo en *E. coli*, y éste sistema logró dominar el campo (Yusibov y Ravindrana, 2008). Como ejemplo de éste sistema, se pueden citar las partículas de hepatitis B, que resultan en la formación de estructuras equivalentes a la nucleocápside. Sin embargo, este sistema se ha desarrollado más bien como un vehículo para expresar epitopos de diversas enfermedades, en lugar de usarse como vacuna (revisado por Noad y Roy, 2003). Este sistema ha sido superado por células eucariotas, que pueden producir proteínas más complejas; como ejemplo están las levaduras, que crecen de manera similar a las bacterias, pero que son capaces de llevar a cabo N-glicosilación (Yusibov y Ravindrana, 2008).

Sistema procarionte

La principal diferencia entre utilizar un sistema de expresión procarionte o eucarionte radica en la complejidad de la proteína. Muchas proteínas recombinantes se producen en *E. coli*, y este sistema frecuentemente es la elección preferida, por ser económico, ofrece rapidez en el tiempo de cultivo, y por su capacidad de lograr gran biomasa y alto rendimiento en la producción de proteína. Sin embargo a diferencia de las células de mamíferos, *E. coli* no es capaz de sintetizar proteínas de alta complejidad (Assenberg *et al.*, 2013).

El sistema procarionte ha sido la estrategia más exitosa para producir miligramos de proteína, pero frecuentemente no es apropiado para la expresión de proteínas eucariotes o proteínas virales, debido a la toxicidad de la macromolécula extraña, diferencias en la maquinaria del plegamiento de la proteína, o debido a la falta de modificaciones postraduccionales en este sistema (Aydin *et al.*, 2012).

Sistema eucariote

Las células de mamífero son una elección lógica para la producción de vacunas de subunidades, y los antígenos virales tienen modificaciones similares a las proteínas expresadas *in vivo* (Yusibov y Ravindrand, 2008). Sin embargo, los costos son elevados, se requiere un equipo de laboratorio especializado, el rendimiento es bajo, y se necesita mucho tiempo para el desarrollo de líneas celulares con expresión estable (Aydin *et al.*, 2012). Otras desventajas son: los consumibles, la validación del producto, pruebas para garantizar que la proteína es libre de patógenos y que no contiene agentes oncogénicos, lo que hace que esta plataforma no sea viable (Yusibov y Ravindrand, 2008).

Para las vacunas basadas en plantas, la estrategia más utilizada es el uso de transgénicos, donde los transgenes que codifican para el antígeno se transfectan al genoma nuclear de la planta por medio de partículas de metal (Yusibov y Ravindrand, 2008).

Las levaduras también se han utilizado para la producción de proteínas recombinantes. *Saccharomyces cerevisiae* fue la primera levadura utilizada para este fin, y es la más empleada, siendo capaz de llevar a cabo N-glicosilación, aunque los glicanos frecuentemente difieren de aquellos encontrados en mamíferos (Yusibov y Ravindrand, 2008). Existe actualmente una vacuna de hepatitis B producida en levadura, que contiene estructuras equivalentes a las que se encuentran en el plasma de individuos infectados de este virus y es la VLP mas

discutida a la fecha porque fue la primera en ser exitosamente comercializada (revisado por Noad y Roy, 2003).

Otra forma de producir proteínas recombinantes es utilizando el sistema baculovirus, en líneas de células de insecto. Este sistema es uno de los más prometedores, y actualmente existen en el mercado algunas vacunas aprobadas por la FDA basadas en este sistema, que incluso han mostrado ventajas sobre otras vacunas aprobadas producidas en otros sistemas (Cox y Holliester, 2009; Yang, 2013).

El sistema baculovirus se ha utilizado para la producción de proteínas heterólogas, y tiene un amplio rango de usos; es un sistema complejo que necesita ser ampliamente expuesto en este trabajo.

El sistema baculovirus

Los baculovirus son virus de insectos usados como agentes de control biológico y como vectores de expresión de proteínas heterólogas (Payne y Kalmakoff, 1978; Blissard y Rohrmann, 1991; Xin-Gang y Hung-Jen, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009). Para la producción de proteínas recombinantes se utilizan algunas líneas celulares de insecto; una de las más utilizadas es *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) (Blissard y Rohrmann, 1991). Ésta es una de las mejores líneas celulares, ya que pueden producir más oligosacáridos fucosilados y predominantemente estructuras de dimanosa y trimanosa (Kulakosky *et al.* 1998a). Esta tecnología permite producir proteínas de calidad. La generación de baculovirus recombinantes se da por transposición *in vitro* en *E. coli* y el sistema es comercializado como sistema Bac-to-Bac®. Este sistema reúne muchas características de las células de mamífero, como cambios postraduccionales debidos a una maquinaria de plegamiento similar. El proceso en conjunto con la sobre-expresión de proteínas heterólogas utilizando esta tecnología involucra la

(co) transfección de células de insecto, seguido por una o dos rondas de amplificación viral. Es más tardado que la expresión en bacterias, pero es compensado por el alto rendimiento y una mejora en la calidad de la proteína (Assenberg *et al.*, 2013).

Hay especial interés en el potencial de las células de insecto para producir glicoproteínas recombinantes de vertebrados con oligosacáridos similares a las proteínas originales, una característica que les falta a muchas otras tecnologías de vectores de expresión. Las larvas de los lepidópteros también son utilizadas para dirigir la expresión de proteínas recombinantes por medio del sistema baculovirus. La mayoría de glicoproteínas recombinantes de mamíferos producidas en baculovirus son sintetizadas con oligosacáridos de manosa u oligosacáridos menos completos comparados con la proteína nativa producida en el tejido original. Sin embargo se han reportado proteínas recombinantes con pequeñas cantidades de oligosacáridos terminados con hexosamina y galactosa como en el plasminogen, el interferón, y la IgG. Tanto la estructura intrínseca de la glicoproteína como el tipo de célula donde es expresada, pueden tener gran influencia en la adición de los oligosacáridos (Kulakonsky *et al.*, 1998b).

El mayor componente proteico de las células infectadas por baculovirus es la poliedra, estructura formada por una proteína de 29 kDa llamada poliedrina. La poliedrina no es esencial para la replicación en cultivo celular, pero su síntesis es dirigida por un fuerte promotor tardío. La presencia o ausencia de poliedrina puede visualizarse en microscopio de luz. Estas características fueron explotadas por los laboratorios de Summers y Smith (1987) y Miller (1988) para establecer un sistema de expresión eucariote basado en baculovirus, que ahora es de uso común en muchos laboratorios. Este sistema depende de la recombinación homóloga entre DNA genómico de baculovirus, y DNA plasmídico que lleva un gen extraño flanqueado por secuencias diana de baculovirus. Después de la transfección de los DNAs de baculovirus y plásmidos en las células de insecto, los virus recombinantes son observados con una frecuencia del 1 al 2% (Revisado por

Kamita *et al.*, 2003). Por todo lo anterior, es importante conocer el ciclo biológico de los baculovirus y los fenotipos que se producen durante la infección.

Taxonomía

La familia *Baculoviridae* se caracteriza por contener un gran genoma circular de DNA de doble cadena. Los viriones tienen forma de báculo y son envueltos. Se han identificado varios cientos de especies de baculovirus y se han clasificado en dos géneros: los nucleopoliedrovirus (NPV) y los granulovirus (GV) (Kamita *et al.*, 2003). Éstos difieren en la morfología de los cuerpos de oclusión (OBs) así como la citopatología que inducen (Revisado por Ke *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011).

El virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) es un miembro de la familia *Baculoviridae* que infecta insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* e *Himenoptera* y es uno de los más estudiados (Revisado por Vialard *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 2009). AcNPV es específico de artrópodos, su genoma se encuentra cerrado covalentemente y se replica en el núcleo de sus células huésped (Revisado por Ke *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011). AcNPV fue el primer baculovirus en ser secuenciado completamente y está constituido por 133,894 bp codificando para más de 150 genes (Ayres *et al.*, 1994).

Ciclo de infección

Durante la infección se producen dos formas de progenie: los viriones libres (BVs) y los virus ocluidos (ODV). Los baculovirus son únicos al presentar estos dos fenotipos que juegan roles totalmente diferentes en el ciclo de infección. Los ODVs son responsables de la transmisión horizontal entre los insectos huéspedes, mientras que los BVs se encargan de la diseminación sistémica a través del insecto infectado y su propagación en cultivo celular. Los BVs y los ODVs son

idénticos en sus nucleocápsides e información genética, pero difieren de la fuente de envolturas virales (Braunagel y Summers, 1994; revisado por McCarthy y Theilmann, 2008; Yuan *et al.*, 2011), por lo tanto difieren en antigenicidad, tropismo y tiempo de aparición en el ciclo de infección viral. Los OBs están ocluidos en la poliedra, estructura proteica cristalina, que sirve para mantener viables a los baculovirus en el ambiente (Horton y Burand, 1993).

Infección primaria: los virus ocluidos

El inicio de la infección natural comienza cuando los OBs son consumidos por larvas de insecto. El pH alcalino del intestino medio de estas larvas activa una proteasa codificada por el virus, cuyo sustrato principal es la poliedrina, componente más abundante de las poliedras, liberando los ODVs dentro del lumen intestinal de la larva (Horton y Burand, 1993; Haas-Stapleton *et al.* 2004). El pH óptimo para activar esta proteasa es de 9.6 (Payne y Kalmakoff, 1978).

Los ODVs accesan a las células epiteliales del intestino medio después de ser liberados de los OBs causando la infección inicial. Los viriones entran en las vellosidades por la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática. Los baculovirus codifican proteínas denominadas “factores de infectividad *per os*” (PIFs) presentes en la superficie de los ODVs cuya función es iniciar la infección primaria en el intestino medio; las proteínas más importantes son pif-0, pif-1, pif-2, pif-3, pif-4 y odv-e56. Otra proteína es odv-e66 que se expresa en la infección tardía y codifica una proteína de envoltura de los ODVs, y está fijada en el N-terminal de la envoltura. Odv-e66 juega un rol importante en la infección primaria de los baculovirus en el intestino medio de los lepidópteros (Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Revisado por Sparks *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). En la infección tardía, las nucleocápsides adquieren una envoltura para formar los viriones pre-ocluidos y los viriones resultantes son incrustados en una matriz cristalina constituida principalmente de poliedrina, para formar nuevos ODVs (Rohrman, 1986;

Revisado por Vialard *et al.*, 1990; Oomens y Blissard, 1999; Ke *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2011). Los ODVs son producidos y empaquetados dentro de OBs, y son finalmente liberados en el ambiente al concluir la muerte del insecto infectado, completando el ciclo de infección (Horton y Burand, 1993). Los OBs son responsables de proteger a los viriones del ambiente hasta que otro huésped susceptible sea infectado (Ribeiro *et al.*, 2009; Slack y Arif, 2007).

Otra proteína importante en la formación de la poliedra es p10, que se expresa en altos niveles en la infección tardía y está asociada a la poliedra. Esta proteína de 10 kDa juega un papel importante en la morfogénesis de la poliedra, ya que los mutantes con la ausencia de p10 producen OBs frágiles. (Revisado por Vialard *et al.*, 1990). La formación de la poliedra parece depender de la interacción entre la poliedrina y otras proteínas celulares y virales, así como de su propia secuencia de aminoácidos (aa) (Ribeiro *et al.*, 2009).

Infección secundaria: los virus libres

Los BVs son producidos después de la infección primaria y no se encuentran ocluidos (Horton y Burand, 1993). Los BVs se diseminan vía hemolinfa y sistema traqueal en otros tejidos del insecto (Haas-Stapleton *et al.* 2004; Revisado por Sparks *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011).

Los BVs entran por endocitosis mediada por receptor, proceso dependiente de pH ácido, donde participa la proteína gp64 presente solo en la envoltura de los BVs que es necesaria para la infección por esta vía (Blissad y Wenz, 1992; Horton y Burand, 1993; Chernomordik, *et al.*, 1995). El gen de gp64 de AcNPV codifica una proteína de 511 aa, necesaria para la infección, pues los anticuerpos contra gp64 pueden neutralizar la infección de los BVs. La infección de los BVs también se puede prevenir por tratamiento con agentes que evitan la acidificación del

endosoma, como el cloruro de amonio, resaltando el mecanismo de entrada de los BVs en la célula huésped (Revisado por Monsma y Blissard, 1995).

Se ha mostrado la fusión de baculovirus con células de insecto. La gp64 también se ha expresado en células no infectadas, por medio de transfección, permitiendo la fusión de membranas entre éstas células, inducida con ácido, indicando que gp64 por si sola es suficiente para la fusión de membranas de la envoltura viral con la membrana endosomal (Revisado por Monsma y Blissard, 1995). gp64 interactúa con los fosfolípidos de membrana de las células de insecto o mamífero permitiendo la unión o penetración del baculovirus (Tani *et al.*, 2001).

Después de la infección de la larva, se forman nuevas nucleocápsides que egresan del núcleo y son transportadas a la membrana celular, gemando de la célula, por lo que adquieren su envoltura de la membrana plasmática (Haas-Stapleton *et al.* 2004; Revisado por Sparks *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). Esta envoltura esta flojamente adherida y contiene gp64 que tiene forma de espículas presentada como homotrímero (Oomens *et al.*, 1995). Un dominio de 7 aa constituye el dominio citoplásmico de gp64 necesario para la gemación eficiente (Oomens y Blissard, 1999).

Por lo tanto los Bvs son responsables de la infección célula a célula, mientras que los ODVs se requieren para la transmisión de insecto a insecto.

Estabilidad de la poliedra

Los baculovirus no cuentan con huéspedes reservorios o estados de latencia como los herpesvirus, además los insectos presentan una vida corta en comparación con otras clases de animales, y su ciclo de vida es cíclico y estacional. Hay largos periodos donde los insectos no se reproducen. Por lo tanto, los virus de insecto han desarrollado características más robustas para persistir por largos periodos en el ambiente. Los ODVs presentan un estado inactivo, pero

son viables en el ambiente por décadas y tal vez por siglos, mientras que la envoltura de los BVs normalmente los hace susceptibles a desecación y pérdida de la viabilidad fuera del huésped (Slack y Arif, 2007).

Transcripción y replicación del DNA

Durante el proceso de infección, los genes virales se expresan de manera coordinada y son clasificados en base al estado de la replicación del DNA viral. Los genes tempranos son expresados antes de la replicación viral y están involucrados directamente en el proceso de síntesis de DNA, mientras que los genes tardíos se expresan durante la replicación del DNA. Muchos de estos genes codifican proteínas estructurales del virión. Un subgrupo de estos genes, los genes muy tardíos codifican productos implicados en el proceso de oclusión (Revisado por Lu y Carstens, 1991). La transcripción de genes tempranos comienza con la unión de la RNA polimerasa II del huésped y una secuencia conservada TATA que se encuentra en la mayoría de genes tempranos.

La transcripción tardía y muy tardía es mediada por un RNA polimerasa codificada por el virus e inicia por una secuencia altamente conservada TAAG que es también encontrada en la mayoría de los promotores genéticos tardíos y muy tardíos (Ayres *et al.*, 1994; Revisado por Yang y Miller, 1998; Ke *et al.*, 2008). La mayoría de las proteínas estructurales se expresan como genes tardíos, la expresión de gp64 es regulada tanto por promotores tempranos como por tardíos (Blissard y Rohrmann, 1991).

Seguridad

Debido a la utilización de los baculovirus como pesticidas biológicos y por razones de seguridad, se han realizado estudios entre baculovirus y células no permisivas. Los primeros estudios sugirieron que estos virus pueden ser capaces

de replicarse en células no permisivas de mamífero. Aunque se ha demostrado que los baculovirus pueden penetrar en células de mamíferos, se han realizado extensos esfuerzos para detectar la replicación viral productiva en mamíferos, con resultados negativos (Revisado por Kost y Condreay, 2002). Aunque los BVs pueden entrar en un amplio rango de células filogenéticamente diferentes, no llegan al núcleo en la mayoría de ellas (Haas-Stapleton *et al.*, 2004). Únicamente los baculovirus recombinantes con un promotor activo de mamífero como el de citomegalovirus, son capaces de producir transducción en células de mamífero (Revisado por Kitajima *et al.*, 2006 y por Kost y Condreay, 2002).

Por otro lado, el sistema de producción de proteínas fusionadas a poliedrina, ha resultado segura en vertebrados (Kim *et al.*, 2011); además utilizando células de insecto en lugar de células de mamífero, el riesgo de cultivar patógenos oportunistas se minimiza (revisado por Noad y Roy, 2003).

Rendimiento

El sistema baculovirus permite la producción de gran cantidad de proteína recombinante en células eucariontes, lo que resulta en una elevada recuperación de antígeno plegado. Este sistema se puede ser utilizado para la producción de vacunas a gran escala (revisado por Noad y Roy, 2003).

N-glicosilación

La N-glicosilación es otra característica de éste sistema, y es una de las modificaciones postraduccionales más importantes. La presencia de los N-glicanos juega un rol principal en el plegamiento y control de calidad en las glicoproteínas, y puede influenciar la estructura y estabilidad de la proteína protegiéndola de la proteólisis. Esto tiene significancia terapéutica, veterinaria, médica y diagnóstica, donde se determina la especificidad de las interacciones

proteína-proteína y el reconocimiento del antígeno (revisado por Harrison y Jarvis, 2006).

Los eventos principales de la N-glicosilación son conservados entre vertebrados, invertebrados, plantas y hongos. El primer paso ocurre en retículo endoplásmico (ER) donde un oligosacárido es transferido a la cadena lateral amino de un residuo de asparagina de una secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa es cualquier aa excepto prolina) (Fig. 4 – I). Antes de que el oligosacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (glucosa, manosa y N-acetilglucosamina) se transfiera a la asparagina se debe procesar por una serie de glicosidasas en ER y aparato de Golgi. Las α -glucosidasa I cataliza la glucosa terminal y la α -glucosidasa II remueve los siguientes dos residuos terminales de glucosa produciendo $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 4 – II). Después se remueven 4 residuos de manosa por α -manosidasas clase I para producir $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Fig. 4 – III). En altos eucariontes, este proceso comienza en ER y continúa a través de la acción de varias manosidasas en aparato de Golgi. Después se añade N-acetilglucosamina por la N-acetilglucosaminiltransferasa en la rama menor (Fig. 4 – IV) y finalmente se agrega una molécula de fucosa por medio de fucosiltransferasa (Fig. 4 – V). El resto de modificaciones enzimáticas difiere entre células de insecto y células de mamífero. En las células de insecto participan N-acetilglucosaminidasa, N-acetilgalactosamiltransferasa y fucosiltransferasas (Fig. 4 – i), mientras en las células de mamífero participan N-acetilgalactosamiltransferasa II, III, IV y V, galactosiltransferasas y sialiltransferasas (Fig. 4 – ii, iii y iv) (revisado por Harrison y Jarvis, 2006).

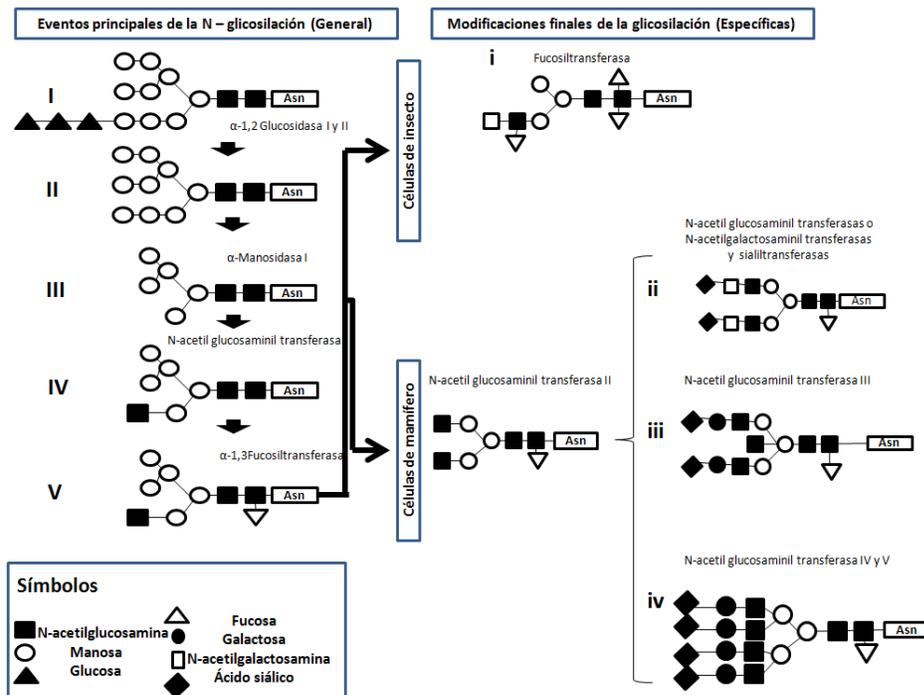


Fig. 4. Representación esquemática de las rutas de glicosilación en células de insecto y de mamífero. El esquema muestra la vía de glicosilación general tanto para insectos como para mamíferos, así como sus diferencias en la adición de moléculas por medio de enzimas específicas de insecto o de mamífero (Modificado de Harrison y Jarvis, 2006).

Aunque las glicoproteínas producidas en células de insecto típicamente poseen solo estructuras simples de manosa, se han realizado extensas investigaciones enfocadas en vías para obtener una glicosilación compleja en proteínas expresadas en células de insectos. Una mejora ha sido el uso de líneas celulares de insecto con capacidades de glicosilación superior en conjunto con la optimización del cultivo. Tn-4H es una variante de la línea Tn5B1-4, una línea de *Trichoplusia ni*, donde se ha observado la presencia completa de N-glicosilación, así como de sialilación. Otra mejora ha sido mediante la inserción de genes de glicosiltransferasas de mamíferos dentro de células de insecto (Joosten y Shuler, 2003). En contraste, la glicosilación compleja no es ningún inconveniente al utilizar el sistema baculovirus.

Producción de antígenos recombinantes utilizando el sistema baculovirus

Generalmente la producción de antígenos en este sistema se realiza bajo el promotor de poliedrina o p10 para producir la proteína de manera soluble o fusionada a gp64 (Xing-Gang y Hung-Jen, 2008). Más recientemente se han fusionado antígenos al gen de poliedrina para la producción de partículas que contienen al antígeno (Kim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Baculovirus display

El gen de gp64 se utiliza para generar BVs que permitan el despliegue de proteínas heterólogas en la superficie viral por medio de inserción de la proteína de interés entre el péptido señal N-terminal y el dominio de membrana C-terminal (Lindley *et al.*, 2000). Este método se ha utilizado para desarrollar baculovirus pseudotipados como una plataforma para vacunas (Xing-Gang y Hung-Jen, 2008). Se ha demostrado que de esta manera se confiere una buena protección contra una amplia variedad de patógenos incluyendo virus y parásitos (Tami *et al.*, 2004; Meneses-Ruiz *et al.*, 2011).

Xing-Gang y Hung-Jen (2008), insertaron los dominios de los péptidos de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica en el gen de gp64. La capacidad del virus para desplegar la proteína de fusión en su conformación nativa, presumiblemente con todas sus modificaciones postraduccionales en las células de insecto, puede aumentar la inmunoreactividad de los antígenos desplegados. La expresión es rápida y no hay necesidad de purificar las proteínas recombinantes.

Poliedras recombinantes

El desarrollo de poliedras recombinantes es otra estrategia eficiente para la producción de vacunas de subunidades virales. El antígeno de interés se expresa fusionado a la poliedrina utilizando este mismo promotor. Lee *et al.* (2012), sintetizaron un péptido de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica, fusionado a la poliedrina completa. Los ratones inmunizados con la proteína E2 soluble purificada de las poliedras, produjeron altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la fiebre porcina clásica, utilizando adyuvante. Kim *et al.* (2012), del mismo grupo de investigadores expresaron gB y gC de pseudorabia, cada una fusionada al gen de poliedrina. Los baculovirus recombinantes expresaban la poliedra nativa seguida de un sitio de corte del factor Xa y la proteína de fusión (poliedra y gB o poliedra y gC). La poliedra resultó tener una morfología normal y la proteína de fusión fue detectada usando anticuerpos anti-gB o anti-gC y anti-poliedrina por medio de western blot.

Producción y purificación de las proteínas de fusión

Para la purificación de los antígenos fusionados a poliedrina como se mencionó arriba (Kim *et al.*, 2012), las poliedras se pueden purificar de manera relativamente fácil: las poliedras recombinantes se obtienen de la hemolinfa de los gusanos infectados por los baculovirus recombinantes, y las poliedras se solubilizan en PBS en presencia del 0.1% de SDS pH 12 por 30 minutos a temperatura ambiente y la muestra solubilizada se centrifuga a 12,000 *g* por 10 min. El sobrenadante se coloca en columnas y es centrifugado a 12,000 *g* por 20 min. La poliedra recombinante se lava con PBS pH 7 y se colecta. Las proteínas de fusión se obtienen de la poliedra recombinante solubilizada usando columnas de níquel seguida de un tratamiento con el factor Xa a 25°C por 2 h. Esta estrategia presenta como una de las mejores ventajas: la producción de grandes cantidades de antígeno por larva. Se puede producir más de 0.6 mg por larva y el

rendimiento es mayor cuando se procesan las hemolinfas de los gusanos hasta los 6 días post-infección, por lo que resulta una manera económica para producir antígenos.

Limitantes de las vacunas de nueva generación

Muchas vacunas en desarrollo se basan en subunidades purificadas, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. Estas vacunas de nueva generación son más seguras y ofrecen ser alternativas a las vacunas tradicionales. Sin embargo, estos antígenos frecuentemente son poco inmunogénicos y requieren ser co-administrados con adyuvantes para inducir una respuesta inmune óptima (Akagi *et al.*, 2012). Es por eso que es de gran importancia el desarrollo de mejores adyuvantes (Singh y O'Hagan, 2002).

Los adyuvantes en la producción de vacunas

Actualmente una de las cuestiones de importancia en la vacunación es la necesidad por nuevos adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias usadas en combinación con un antígeno específico que logran producir una respuesta inmune más robusta que la que se produce con la aplicación del antígeno solo (Akagi *et al.*, 2012). Los adyuvantes se utilizan frecuentemente para potenciar la respuesta inmune en vacunas inactivadas, incrementando así la respuesta inmune específica contra estos antígenos (Petrovsky y Aguilar, 2004).

Los adyuvantes activan la señalización a través de PRRs. Uno de los prerrequisitos necesarios de un adyuvante es que tenga la capacidad para hacer madurar a las DCs (Norton *et al.*, 2010).

Se han realizado muchos esfuerzos por clasificar a los adyuvantes basándose en su mecanismo de acción (Cox y Coulter, 1997), pero en general los podemos clasificar en dos: 1.- Inmunoestimulantes: son derivados principalmente de patógenos que representan PAMPs como LPS, monofosforil lípido A y el CpG; y 2.- adyuvantes basados en partículas: como las emulsiones, micropartículas, iscoms (complejos inmunoestimulantes) y liposomas que funcionan como antígenos asociados a una diana para las APCs (Singh y O'Hagan, 2002) (Fig. 5).

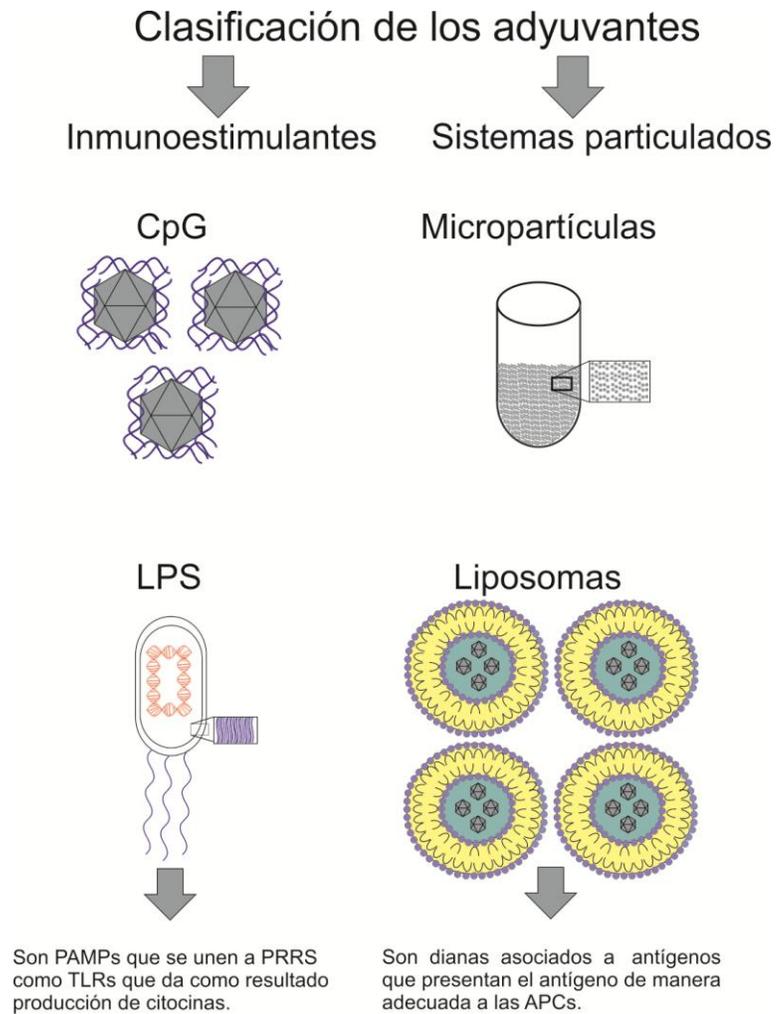


Fig. 5. Clasificación generalizada de los adyuvantes. Los adyuvantes inmunoestimulantes como PAMPs se unen a PRRs como los TLRs resultando en la liberación de citocinas proinflamatorias. Los adyuvantes particulados presentan dimensiones comparables a las de los patógenos y facilitan la entrega del antígeno. Esta última clase de adyuvantes puede también incluir a los inmunoestimulantes para incrementar el nivel de respuesta o enfocar dicha respuesta.

Es importante destacar que a pesar de esta amplia variedad de opciones, solamente pocos adyuvantes han sido aceptados para uso humano (Cox y Coulter, 1997).

Adyuvantes con licencia

El hidróxido de aluminio

El adyuvante ampliamente aceptado para su aplicación en vacunas tanto de uso humano como veterinario es el hidróxido de aluminio (Cox y Coulter, 1997; Baylor *et al.*, 2002). Éste adyuvante continúa siendo uno de los más usados y tiene buen historial de seguridad, bajo costo y buen efecto adyuvante con una amplia variedad de antígenos y es una buena opción para las infecciones que se pueden prevenir mediante la inducción de anticuerpos séricos (Akagi *et al.*, 2012).

Por otro lado, el hidróxido de aluminio presenta algunos inconvenientes: no es efectivo para todos los antígenos, debido a que no posee la capacidad de aumentar la respuesta inmune celular, además de inducir reacciones locales y promover una respuesta alérgica mediada por IgE. También se ha asociado a reacciones severas como eritema, nódulos subcutáneos e hipersensibilidad por contacto (Baylor *et al.*, 2002; Akagi *et al.*, 2012; Kool *et al.*, 2012).

El monofosforil lípido A

Actualmente el monofosforil lípido A (MPL) se está utilizando en los Estados Unidos y en Europa en las vacunas contra hepatitis B y papiloma humano. Se ha comprobado que el MPL ejerce un efecto sinérgico con el hidróxido de aluminio. El MPL promueve la producción de IL-6, requerida para la diferenciación de CTL, induce la producción de granzima B e inhibe PD1, proteína inhibidora presente en la superficie de CD8⁺ (Mbow *et al.*, 2010; MacLeod *et al.*, 2011).

Emulsiones

En Europa se aprobó la emulsión de aceite en agua basada en escualeno para vacunas contra influenza y se ha demostrado que incrementa los títulos de inhibición de la hemaglutinación. Entre estos adyuvantes podemos citar MF59 y AS03 que se han utilizado en vacunas contra la influenza pandémica H1N1 del 2009, y las pruebas clínicas han mostrado una eficiencia superior a los adyuvantes de aluminio (Mbow *et al.*, 2010).

Acarreadores y sistemas de entrega en desarrollo

Baculovirus

Meneses-Ruiz *et al.* (2011) mencionan que AcNPV posee una fuerte capacidad adyuvante en mamíferos y que promueve el incremento de la respuesta inmune celular contra los antígenos co-administrados siendo capaz de inducir maduración de APCs y producción de citocinas proinflamatorias a través de TLR9, como sucede con CpG, un adyuvante basado en deoxidinucléotidos, lo que apoya su uso potencial como vector vacunal. Además AcNPV incrementa la capacidad estimuladora de linfocitos T hacia una respuesta inflamatoria basada en Th1.

Proteínas y péptidos adyuvantes

En años recientes, la presentación de péptidos y pequeñas moléculas antigénicas en la superficie de ensamblados macromoleculares ha surgido como una poderosa estrategia para producir una respuesta inmune sin el uso de adyuvantes y han demostrado una excelente capacidad adyuvante induciendo fuertemente tanto inmunidad humoral como celular. El péptido Q11 formado principalmente por glicinas, cuya estructura secundaria es una β -plegada, tiene la capacidad de autoensamblarse formando nanofibras, y se ha demostrado que puede actuar como un potente adyuvante cuando es fusionado al péptido

antigénico, pero sin provocar inflamación (Rudra *et al.*, 2010 y 2012; Chen *et al.*, 2013).

Mallajosyula *et al.* (2013), conjugaron químicamente la HA de influenza a la superficie del virus del mosaico del tabaco, y demostraron que sirve de manera efectiva como acarreador de antígenos. Una sola aplicación de 15 µg de HA en un modelo murino, logró producir una potente inmunogenicidad y títulos altos de inhibición de la hemaglutinación. Una sola dosis fue suficiente para generar el 50% de sobrevivencia o 100% de sobrevivencia con adyuvante, comparado con el 10% de sobrevivencia después de la vacunación con una vacuna disponible comercialmente contra la influenza H1N1.

Otros trabajos se han centrado en el uso de citocinas, particularmente en IFN- γ , que es uno de los más estudiados y es efectivo aun cuando simplemente se mezcla con el antígeno antes de su inmunización. Un medio conveniente de unión de un antígeno vacunal y el IFN- γ es produciéndolo como una proteína quimérica recombinante (Arnon y Ben-Yedidia, 2003).

Micro y nanopartículas

Los biomateriales como el ácido poliglicólico (PLGA) y las películas de quitosan son polímeros que tienen la capacidad de promover un fenotipo maduro de las DCs, mientras que las películas de agarosa y las de ácido hialurónico mantienen un fenotipo inmaduro (Babensee y Paranjpe, 2005 y 2006). El PLGA y el quitosan cumplen con el prerrequisito para ser considerados como adyuvantes, teniendo la capacidad inmunomoduladora de afectar la respuesta inmune hacia el antígeno (Norton *et al.*, 2010). El uso de PLGA incrementa la respuesta humoral contra el antígeno. Por consiguiente, los biomateriales se pueden utilizar para controlar el fenotipo de las DCs manipulando la respuesta del huésped, por un lado para suprimir la respuesta inmune inducida por estructuras de ingeniería de

tejidos o bien, para aumentar la inmunidad protectora inducida por una vacuna (Bennewitz y Babensee, 2005; Norton *et al.*, 2010).

Otro punto a considerar, es que las vacunas por definición son profilácticas, sin embargo en estos años se ha visto un interés en el desarrollo de vacunas terapéuticas (Arnon y Ben-Yedidia, 2003). El desarrollo de vacunas terapéuticas y preventivas se ha enfocado en la capacidad de la distribución del antígeno hacia las DCs de manera específica y prolongada. Estas estrategias utilizan nanopartículas que pueden alcanzar la longevidad del antígeno intacto y aumentar la capacidad de captación y procesamiento por parte de las DCs (Akagi *et al.*, 2012).

También se ha evaluado el tiempo necesario para la producción de anticuerpos, así como su duración, aplicando micro y nanopartículas de PLGA. Los resultados han mostrado que la producción de anticuerpos ocurre a los 75 días y declinan a los 120 días en las micropartículas y que, al igual que los adyuvantes en emulsión, las micropartículas aumentan el tiempo de retención de los antígenos. En las nanopartículas, la producción de anticuerpos ocurre a los 60 días y declinan a los 90 días aproximadamente, lo que indica que las nanopartículas promueven una producción de anticuerpos de manera más rápida en comparación con las micropartículas, pero la inmunidad humoral producida por estas últimas es más duradera (Fredriksen *et al.*, 2012). Estas micropartículas pueden producir niveles más altos de anticuerpos que los geles de hidróxido de aluminio, y son capaces de montar respuestas Th1 y Th2 y promover una secreción de IgE más baja que otros adyuvantes (Mata *et al.*, 2007 y 2010).

Estabilidad de las partículas

La cadena fría requerida durante el transporte de las vacunas, es necesaria para protegerlas de la degradación por calor. Sin embargo, el almacenamiento y

transporte de las vacunas en refrigeración es muy costoso, y no siempre es posible. Hay gran problemática para el uso de vacunas en países de tercer mundo. Los parámetros físicos, químicos e inmunológicos de las vacunas varían según la temperatura en la que se almacenen. Por esto, es de gran importancia la evaluación de la estabilidad de las vacunas (Diminsky *et al.*, 2000).

La estabilidad de las micropartículas se ha evaluado determinando la liberación del antígeno en la fase soluble. Las nanopartículas liberan el 10% del antígeno en 120 días a pH neutro a 8 °C, mientras que las micropartículas liberan del 12 al 35% en el mismo periodo de tiempo, en las mismas condiciones. La mayor parte de liberación del antígeno ocurre en los primeros 4 días (Fredriksen *et al.*, 2012).

Las partículas son de liberación prolongada

En veterinaria existen vacunas de una sola aplicación que son muy efectivas, tal es el caso de algunas vacunas contra circovirus porcino tipo 2; enfermedad viral que causa síndrome de desgaste multisistémico post destete en cerdos. Dichas vacunas utilizan emulsiones como adyuvantes en partículas, y son capaces de producir altos títulos de anticuerpos (Seo *et al.*, 2014). Es importante evaluar la respuesta humoral producida por una sola aplicación del antígeno.

En el caso de las partículas de PLGA, actúan como depósitos que permanecen semanas o varios meses y sirven como una excelente diana cuando miden < 5 µm de diámetro. Además ofrecen ser una buena opción para vacunas de una sola dosis debido a su liberación prolongada, aunque su preparación es difícil (Cox y Coulter, 1997).

Adyuvantes de uso común en la investigación

Los adyuvantes completo e incompleto de Freund

El adyuvante completo de Freund (FCA) fue desarrollado de una emulsión de agua y aceite mineral que contiene micobacterias muertas y es uno de los adyuvantes más potentes. A pesar de que algunos lo consideran el adyuvante estándar de oro, causa severa reacción local y es tóxico para uso humano. El adyuvante incompleto de Freund (IFA), consiste en una emulsión de agua sin la adición de micobacterias, siendo menos tóxico y fue utilizado en vacunas para humanos (Petrovsky y Aguilar, 2004).

La proteína verde fluorescente como modelo antigénico

La proteína verde fluorescente (GFP) es una de las proteínas más importantes en la investigación biológica y médica, y ha sido ampliamente modificada para su uso como un marcador de expresión genética y localización proteica, y como un indicador de interacciones proteína-proteína (Citado por Huang *et al.*, 2007). La GFP alcanza su pico máximo de emisión a los 508 nm. El gen de GFP contiene toda la información para la síntesis postraducciona del cromóforo (Tsien, 1998). El cromóforo es incluido en el interior de la proteína rodeada por un barril de 11 β -plegadas y está formado por los residuos Ser65, Tyr66 y Gly67, que emiten una fluorescencia verde. (Citado por Huang *et al.*, 2007) (Fig. 6).

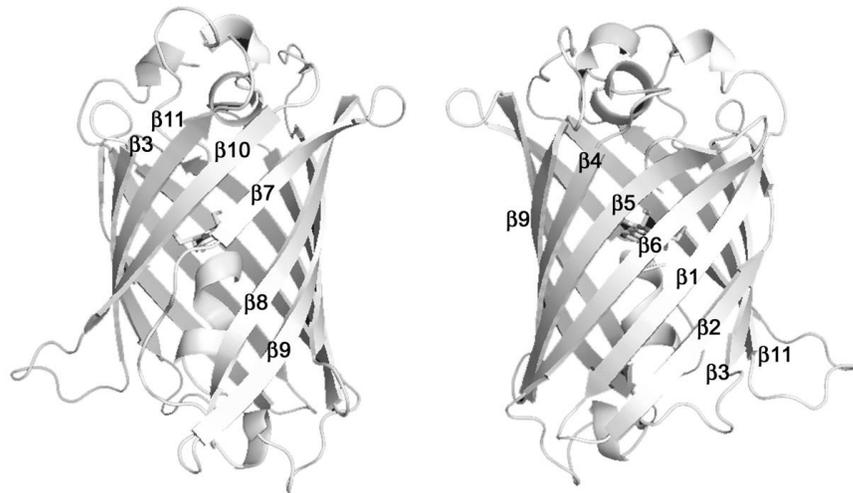


Fig. 6. Representación esquemática de la estructura de la GFP. Se muestran las 11 β -plegadas que conforman el barril (Tomado de Huang *et al.*, 2007).

La GFP se utiliza como reportero debido a sus propiedades fluorescentes, esto permite observar la morfología de las estructuras formadas por la interacción de las proteínas o péptidos de fusión, así como tamaño, y que también indica el momento adecuado para su extracción y purificación. Otra ventaja que brinda como antígeno modelo, es que por sí sola, la GFP no es inmunogénica.

En este trabajo se utilizó un baculovirus recombinante que produce micropartículas verdes fluorescentes constituidas por monómeros de un péptido de 110 aa de poliedrina fusionado a GFP (PH110GFP) que fue desarrollado previamente en el laboratorio del Dr. Luis Vaca del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (IFC-UNAM). El objetivo de este estudio fue conocer si las micropartículas PH110GFP son capaces de inducir un efecto adyuvante. Las micropartículas PH110GFP fueron purificadas y se aplicaron en ratones vía IM, realizando serologías cada dos semanas. La evaluación de la respuesta inmune humoral se llevó a cabo por medio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de tipo indirecto. Para el análisis estadístico fue asignada una significancia de $P < 0.05$ utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguida por una prueba de Tukey cuando los datos mostraron normalidad o en su defecto una prueba de Kruskal-Wallis. Se evaluó el posible efecto tóxico o patógeno de las micropartículas PH110GFP, así como la respuesta inmune humoral inducida por una sola inmunización. Se determinó la morfología, tamaño y contenido de las micropartículas PH110GFP por medio de microscopía electrónica de barrido, de transmisión y confocal. La pureza de las micropartículas fue evaluada por medio de un bioanalizador y SDS-PAGE.

Justificación

Las vacunas tradicionales generalmente son capaces de promover una respuesta inmune eficiente basada en anticuerpos y/o células T citotóxicas. Sin embargo estas vacunas han presentado algunos inconvenientes: por un lado, las vacunas basadas en patógenos atenuados pueden revertir a un estado virulento y causar enfermedad; y por otro lado, las vacunas inactivadas parecen ser más seguras, pero es probable que no posean la capacidad para inducir una respuesta inmune adecuada. La inactivación incompleta de los patógenos también es posible.

Actualmente se buscan vacunas más efectivas, con las menores reacciones secundarias posibles, estables, y que posean la capacidad de hacer madurar a las DCs y activar linfocitos B y T. Gracias a avances en bioquímica, genética y microbiología, se ha logrado manipular genes completos o fragmentos de éstos, que codifican para una proteína o péptido del patógeno, cuya aplicación estimula una respuesta inmune específica contra dicho patógeno, que puede neutralizar la infección, pero sin las desventajas de reversión o recombinación. Por lo tanto, las vacunas recombinantes son alternativas a las vacunas clásicas, aunque generalmente se basan en antígenos solubles, presentando menos inmunogenicidad, por lo que se necesita aplicar una cantidad mayor de antígeno y/o adyuvantes, haciendo más costosa la producción de estas vacunas.

Es de gran importancia el desarrollo de adyuvantes más eficientes, y que presenten mínimos efectos colaterales asociados a su aplicación. Se sabe que algunas micropartículas como aquellas basadas en PLGA, tienen un potente efecto adyuvante y pocos efectos adversos. Es por eso que en este trabajo se evaluó la capacidad adyuvante de un péptido de poliedrina; proteína de virus de insecto que tiene la capacidad de formar micropartículas, y que cuenta con las características de: fácil purificación, rendimiento, y estabilidad por ser un cristal de proteína producido por estos virus, para protegerse del ambiente durante años.

Hipótesis

Los ratones inmunizados con las micropartículas PH110GFP producen una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con los ratones inmunizados con GFP soluble, lo que indica su capacidad adyuvante.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar si los ratones inmunizados con micropartículas PH110GFP producen una respuesta humoral mayor que los ratones inmunizados con la GFPs, utilizando un ELISA indirecto.

Objetivos específicos

Confirmar la presencia de GFP en las micropartículas PH110GFP por medio de western blot y microscopía confocal.

Determinar el peso molecular y la pureza de las micropartículas PH110GFP por medio de un bioanalizador y de SDS-PAGE.

Determinar la morfología de las micropartículas PH110GFP por microscopía electrónica de barrido.

Detectar si las micropartículas PH110GFP contienen baculovirus en su interior, por medio de microscopía electrónica de transmisión.

Comparar la respuesta humoral de los ratones inmunizados con micropartículas PH110GFP, con la respuesta de los ratones inmunizados con la GFP soluble por medio de un ELISA indirecto.

Evaluar si la inmunización con micropartículas PH110GFP ejerce una respuesta sinérgica con la co-administración de adyuvantes.

Determinar la duración y títulos de anticuerpos alcanzados con la inmunización con micropartículas PH110GFP

Determinar si el péptido viral produce toxicidad.

Materiales y métodos

La producción de proteínas recombinantes, los estudios de microscopía y los ensayos inmunológicos, se llevaron a cabo en el laboratorio 126 Norte del IFC-UNAM. La inmunización de los ratones se llevó a cabo en el bioterio del IFC-UNAM. El análisis de las proteínas con el bioanalizador se realizó en el Departamento de Medicina y Zootecnia de los Cerdos de la FMVZ-UNAM.

Células y virus

Se utilizó el sistema de expresión baculovirus (Bac-to-Bac®, Life technologies) para la generación del baculovirus recombinante que produce micropartículas PH110GFP (Fig. 7-A). Para esto, el gen que codifica para la GFP fue insertado en el extremo C – terminal de un péptido de 110 aa de poliedrina bajo este mismo promotor. De manera similar se diseñó otro baculovirus para la producción de la GFP soluble (GFPs), el gen de GFP se insertó bajo el promotor de poliedrina pero sin péptido de fusión (Fig. 7-B). La figura 7-C muestra el gen completo de poliedrina sin proteína recombinante.

Los baculovirus recombinantes que producen micropartículas PH110GFP y GFPs fueron propagados individualmente, cada uno en la línea celular Sf-9 (San Diego, CA) en fase logarítmica (1.5×10^6 células/mL). Las células se mantuvieron a 27 °C con agitación de 100 RPM en medio Grace (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con suero fetal bovino al 10% inactivado con calor (Invitrogen, Grand Island, NY) y ciprofloxacina.

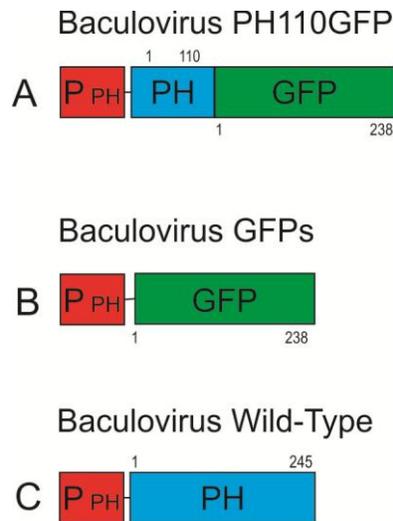


Fig. 7. Gen de poliedrina de los baculovirus recombinantes y Wild Type (WT) utilizados en este estudio. Los baculovirus recombinantes expresan: GFP fusionada a un péptido de 110 aa de poliedrina (PH110GFP) (7-A), o GFP soluble (GFPs) (7-B) bajo el promotor de poliedrina. El baculovirus WT expresa la poliedrina completa (7-C). La imagen muestra el promotor de poliedrina en rojo, el gen de la GFP en verde y el gen o fragmento de poliedrina en azul. El número de aa de cada proteína se muestra en el área superior (poliedrina) o inferior (GFP).

Purificación viral

A las 72 h post-infección (PI), las células se centrifugaron a 3,000 x g durante 10 minutos para eliminar los detritos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 110,000 x g durante 1 h y media a 4°C utilizando un rotor SW-28 Beckman para recuperar los baculovirus. El pellet se resuspendió en PBS pH 7.3 y se purificó por ultracentrifugación utilizando un gradiente de sacarosa. Para esto, se utilizó el protocolo de Luz-Madrigal *et al.* (2008) con ligeras modificaciones. Se utilizaron las concentraciones de 50 y 10% de sacarosa colocando en el fondo del tubo 15 mL de la concentración de sacarosa al 50%, seguida de 15 mL de la solución de sacarosa al 10%, y finalmente se colocaron 2 mL de baculovirus semipurificado y se centrifugó a 110,000 x g 1 h y media a 4°C. Se recuperó rápidamente el virus ubicado entre el gradiente de 50 y 10% y se colocó nuevamente en un tubo de policarbonato agregando 28 mL de PBS y el virus se recuperó por ultracentrifugación como previamente se mencionó. Se

decantó el PBS y los virus purificados se resuspendieron en los restos de PBS durante toda la noche a 4°C. El virus se almacenó a 4° hasta su uso. Se procedió a la titulación viral.

Titulación viral

La titulación del baculovirus se llevó a cabo por ensayo de placa utilizando un protocolo publicado previamente (Luz-Madrigal *et al.*, 2008) con ligeras modificaciones. Se utilizaron placas de 6 pozos con $1.5 - 2 \times 10^6$ células Sf-9 por pozo, incubándolas a 27°C durante 15 min: El virus purificado se diluyó desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , utilizando 450 µL de medio Grace completo y 50 µL del stock viral para la dilución de 10^{-1} , 450 µL de medio Grace completo y 50 µL de la dilución 10^{-1} para la dilución de 10^{-2} y así sucesivamente hasta la dilución de 10^{-14} . Cuando se trabaja con el stock de baculovirus purificado se utiliza una dilución a partir de 10^9 hasta la dilución de 10^{-14} . Después de que las células se adhirieron en la placa, se retiró el medio y se colocaron 400 µL de cada dilución por cada pozo, comenzando con la solución de mayor dilución (10^{-14}) hasta la de menor dilución (10^{-9}). Cada tubo con la dilución respectiva se mezcló bien por medio de un agitador tipo vórtex y se colocó sobre la monocapa. Se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión, calentándola en microondas y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de 40°C. La agarosa se mezcló 1:1 (vol/vol) con medio Grace suplementado (preparando 14 mL en total para una placa de 6 pozos). Se retiró la solución viral de cada uno de los pozos y se colocaron 2 mL de la solución agarosa/medio Grace por cada pozo, y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente o a 4°C hasta que la agarosa se solidificó. Finalmente se colocó 1 mL de medio Grace y la caja se selló con parafilm. La placa se incubó a 27°C durante 3 – 5 días y se observó en microscopio de epifluorescencia.

Producción y purificación de antígenos

Para la producción de micropartículas PH110GFP, las células confluentes de la línea Sf-9 (1.5×10^6 células/mL) fueron infectadas con el baculovirus PH110GFP con una MOI de 10 como previamente se describió (Volkman *et al.* 1976). La suspensión de células se dejó a 100 RPM a 27°C. Después de 72 h PI, las células se centrifugaron a 3,000 x g durante 10 minutos. Se recuperó el pellet y se concentró 100 veces en PBS pH 7.4. Las células se sonicaron utilizando el equipo Sonics vibra cell, modelo VCX130 (Sonics 130 W/50 Hz, USA) con 3 ciclos de un minuto a 60 J/min (equivalente a una amplitud del 35%) para romper membranas celulares, con pausas de 5 minutos en hielo para evitar pérdida de la proteína por calor debido a la sonicación. Las partículas PH110GFP fueron purificadas en tubos eppendorf de 1.5 mL por 5 ciclos de: resuspender en PBS pH 7.4 – centrifugar a 11,700 x g durante 2 minutos – desechar sobrenadante. De la misma manera se obtuvieron poliedras WT mediante infección con baculovirus WT para la comparación morfológica entre poliedras WT y micropartículas PH110GFP. De manera similar se infectaron células Sf-9 con baculovirus GFPs. La GFPs se obtuvo del sobrenadante de las células infectadas 72 h PI. Las proteínas recombinantes se alicuotaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a – 70 °C.

Determinación de la cantidad de proteína y rendimiento

Para la determinación de la cantidad de proteína presente en las micropartículas PH110GFP y GFPs, se utilizó el método del ácido bicinónico (Wiechelman *et al.*, 1988). Se realizó una curva de proteína estándar utilizando albúmina sérica bovina y un análisis de correlación. Finalmente se obtuvo una concentración de 1.4 µg/µL para la GFPs, y de 41.14 µg/µL para las micropartículas PH110GFP. El rendimiento de las micropartículas PH110GFP fue

calculado en mg de proteína por mL de cultivo de células Sf-9 en una densidad de 1.5×10^6 /mL.

SDS – PAGE y western blot

Para corroborar la presencia de GFP en las micropartículas PH110GFP y en el sobrenadante de células infectadas con el baculovirus GFPs, las proteínas se purificaron y se corrieron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se mezclaron con buffer de Laemmli (50 mM Tris-HCl, 3% SDS, 1% β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.7% azul de bromofenol pH 6.8). Finalmente las proteínas se corrieron por electroforesis a 100 volts durante 1 h y media utilizando un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12%. Después de la separación de las proteínas, el gel concentrador se eliminó y el gel separador se utilizó para el western blot y para la tinción con azul de coomassie. Para el western blot, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (MNC) durante 1 h y media a 120 volts en un cuarto frío. La MNC fue bloqueada con leche libre de grasa al 5% y se lavó con TBS mas Tween al 0.1% (TBST). Se colocó el anticuerpo primario anti-GFP (Clontech #632592) producido en conejo diluido con buffer de bloqueo y Tween al 0.1% a una dilución de 1:5000 y se incubó durante 1 hora en agitación a T° ambiente, se lavó 5 veces con TBST. La MNC se incubó con el anticuerpo anti-conejo durante 1 h y nuevamente se lavó. Las membranas de nitrocelulosa se revelaron con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Thermo Scientific) según las recomendaciones del fabricante. Las membranas se revelaron con una película kodak y se capturaron por medio de un fotodocumentador.

Determinación de la pureza de las micropartículas PH110GFP

Para corroborar la expresión, peso molecular y pureza de la GFP fusionada al péptido, las proteínas fueron analizadas por medio de un bioanalizador (Analitek) siguiendo las especificaciones del fabricante, y por medio de SDS-PAGE como previamente se mencionó. Después de correr las proteínas por electroforesis, el gel separador se tiñó con azul de Coomassie durante 2 h y se dejó destiñendo toda la noche con solución de desteñido.

Microscopía electrónica de barrido, de transmisión y confocal

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), de transmisión (TEM) y confocal, las poliedras WT y las micropartículas PH110GFP fueron purificadas y analizadas utilizando una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para la SEM, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos al 0.1 M pH 7.4, post fijadas en tetróxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos. Posteriormente se deshidrataron en gradientes de alcohol. Las muestras fueron secadas al punto crítico y recubiertas con oro para su observación. Para la TEM las muestras fueron incluidas en una resina epóxica de donde se obtuvieron cortes de 90 nm de grosor y fueron contrastadas con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. Para la SEM, las muestras se observaron con el equipo JEOL JSM 5410LV. Para la TEM las muestras se observaron en un equipo JEOL JEM 12000 EXII a 80 kv. Para la microscopía confocal se utilizó el equipo Olympus FV10i. Las imágenes se analizaron con ImageJ.

Aspectos éticos en el uso de animales de laboratorio

Los experimentos con ratones se llevaron a cabo en el bioterio del IFC-UNAM. Los ratones fueron mantenidos en condiciones de esterilidad con agua y

alimentación *ad libitum* durante todo el experimento. El cuidado animal, alojamiento y manejo fueron realizados de acuerdo a lineamientos institucionales, a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO publicada en 1999 en el Diario Oficial de la Federación y al SICUAE (Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales).

Inmunización de los ratones y colección de las muestras

Para la inmunización de los ratones, se utilizó un protocolo previamente descrito, con ligeras modificaciones (Ausubel *et al.*, 2002a). Se utilizaron 5 grupos de 4 ratones hembras de la línea BALB/c de 6 a 8 semanas de edad por cada grupo: Se administró PBS como control negativo; GFPs como control basal; GFPs con adyuvante completo (FCA) e incompleto de Freund (IFA) como control positivo; micropartículas PH110GFP para evaluar el efecto adyuvante del péptido de 110 aa de poliedrina; y finalmente se aplicaron micropartículas PH110GFP con FCA e IFA para evaluar su efecto sinérgico (Tabla 2). Cada aplicación fue de 10 µg, vía IM, excepto donde se utilizó FCA, donde la inmunización fue subcutánea. Se aplicó un refuerzo a las 2 semanas después de la primera inmunización.

Tabla 2. Esquema de vacunación de los grupos experimentales de ratones

	Grupo experimental				
	PBS	GFP _r	GFP _r + FCA/IFA	PH110GFP	PH110GFP + FCA/IFA
µg proteína/µL	0 µg/100 µL	10 µg/100 µL	10 µg/50 µL	10 µg/100 µL	10 µg/50 µL
µL de adyuvante	0 µL	0 µL	50 µL	0 µL	50 µL
Total	0µg/100 µL	10µg/100µL	10µg/100µL	10µg/100µL	10 µg/100µL

PBS: fosfato salino buferado; GFPs: proteína verde fluorescente soluble; GFPs + FCA/IFA: GFPs mas adyuvante completo/incompleto de Freund; PH110GFP: péptido de 110 aa de poliedrina fusionado a GFP; PH110GFP + FCA/IFA: PH110GFP mas adyuvante completo/incompleto de Freund.

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos eppendorf antes de la primera inmunización y cada 2 semanas por punción de la zona submandibular utilizando una lanceta (Golde *et al.*, 2005). El coagulo se eliminó de las muestras por medio de un mondadientes y se centrifugaron a 800 x *g* durante 15 minutos. Los sueros fueron almacenados a – 70°C hasta su uso. Los sueros se analizaron por medio de ELISA indirecto, para evaluar el efecto adyuvante de las micropartículas PH110GFP, la duración de anticuerpos específicos anti-GFP producidos en cada uno de los grupos y el título de anticuerpos.

Prueba de toxicidad y evaluación de la respuesta inmune humoral aplicando una sola dosis de micropartículas PH110GFP

Para determinar si las micropartículas PH110GFP producen algún efecto tóxico, así como para determinar la cantidad de anticuerpos producida por una sola aplicación de estas micropartículas, se utilizaron 6 grupos de 5 ratones hembras de la línea BALB/c de 6 a 8 semanas de edad aplicando grandes cantidades de dicha proteína por vía IM en una sola dosis: PBS, 30, 70, 150, 300 y 600 µg por ratón. Los ratones fueron observados durante 10 semanas y se utilizó la palpación para detectar fibrosis o edema. Cada 2 semanas se tomaron muestras de sangre para determinar si se lograban producir títulos de anticuerpos > 1:500.

ELISA indirecto

La estandarización del ELISA indirecto se llevó a cabo mediante un ensayo criss-cross, utilizando 5 sueros de ratones inmunizados dos veces con 300 µg de micropartículas PH110GFP con intervalos de 15 días. Para la detección de anticuerpos anti-GFP, el ELISA se llevó a cabo utilizando placas de poliestireno de 96 pozos (Corning) tapizadas con 50 µL/pozo de una solución de 1µg/mL de GFP recombinante (GFPr) producida en *E. coli* (Green Fluorecent Protein, Millipore, 14-392) en buffer de carbonato pH 9.6. Las placas se incubaron durante 2 h a 37°C, se lavaron 3 veces con 350 µL/pozo de PBST (PBS Tritón al 0.2%) y se bloquearon con 350 µL/pozo de leche libre de grasa al 2% en PBS (PBSM) durante 1 h a 37°C. Se lavaron nuevamente 3 veces como previamente se describió. Los sueros de los ratones fueron diluidos 1:50 (para evaluar el efecto adyuvante) o logaritmo en base 2 (para el ensayo de titulación de los anticuerpos) con PBSM con Tritón al 0.2%, añadiendo 50 µL/pozo, se incubó durante 1 h a 37°C. La placa se lavó nuevamente 5 veces y se incubó con 50 µL/pozo de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa, diluido a 1:5000 en

PBSM con Tritón al 0.2% durante 1 h a 37°C. La placa se lavó nuevamente 5 veces. Finalmente se añadieron 50 µL de sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) en presencia de H₂O₂. Después de 20 minutos a temperatura ambiente se colocaron 50 µL/pozo de ácido sulfúrico a 0.16M como solución de paro y se realizó la lectura utilizando un lector de placas con un filtro de 490 nm (Bio-Rad Modelo 550).

Análisis estadístico

Las absorbancias de los sueros de los diferentes grupos inmunizados con las proteínas recombinantes obtenidas por ELISA fueron analizadas a través de un ANOVA de dos vías seguido por prueba de Tukey de comparaciones múltiples cuando los datos mostraron normalidad, o de lo contrario por una prueba de Kruskal-Wallis. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism (versión 5; GraphPad Software Inc, San Diego, California, USA).

Resultados

El péptido de 110 aa de poliedrina forma micropartículas verdes fluorescentes cuando se fusiona con GFP

Las células infectadas con baculovirus PH110GFP produjeron micropartículas verdes fluorescentes en forma de poliedras que se localizan en su núcleo (Fig. 8).

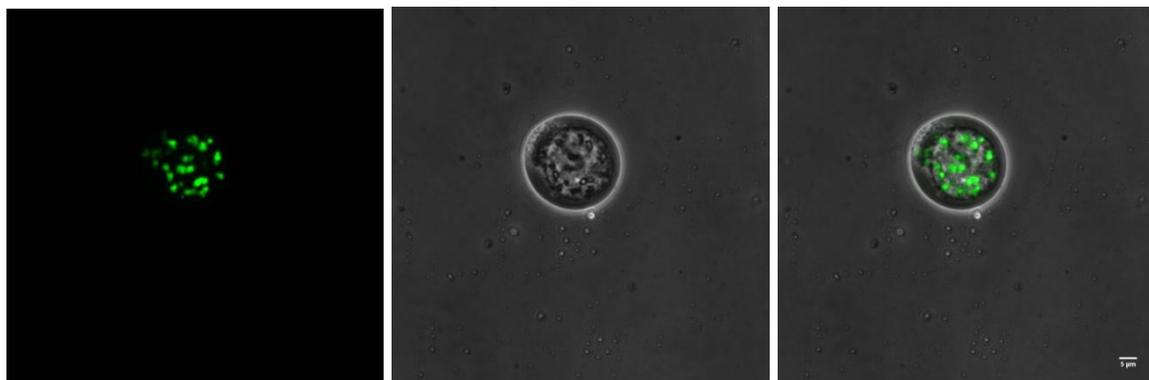


Fig. 8. Existen micropartículas verdes fluorescentes en el núcleo de las células infectadas con baculovirus PH110GFP. Células Sf-9 observadas a las 72 h PI con microscopía confocal. La barra de la derecha representa 5 µm.

La microscopía confocal también mostró que las micropartículas tipo poliedra formadas por el baculovirus PH110GFP, presentan un tamaño variable de 0.5 a 2 µm. Adicionalmente, se muestra la presencia de GFP distribuida en toda la partícula (Fig. 9).

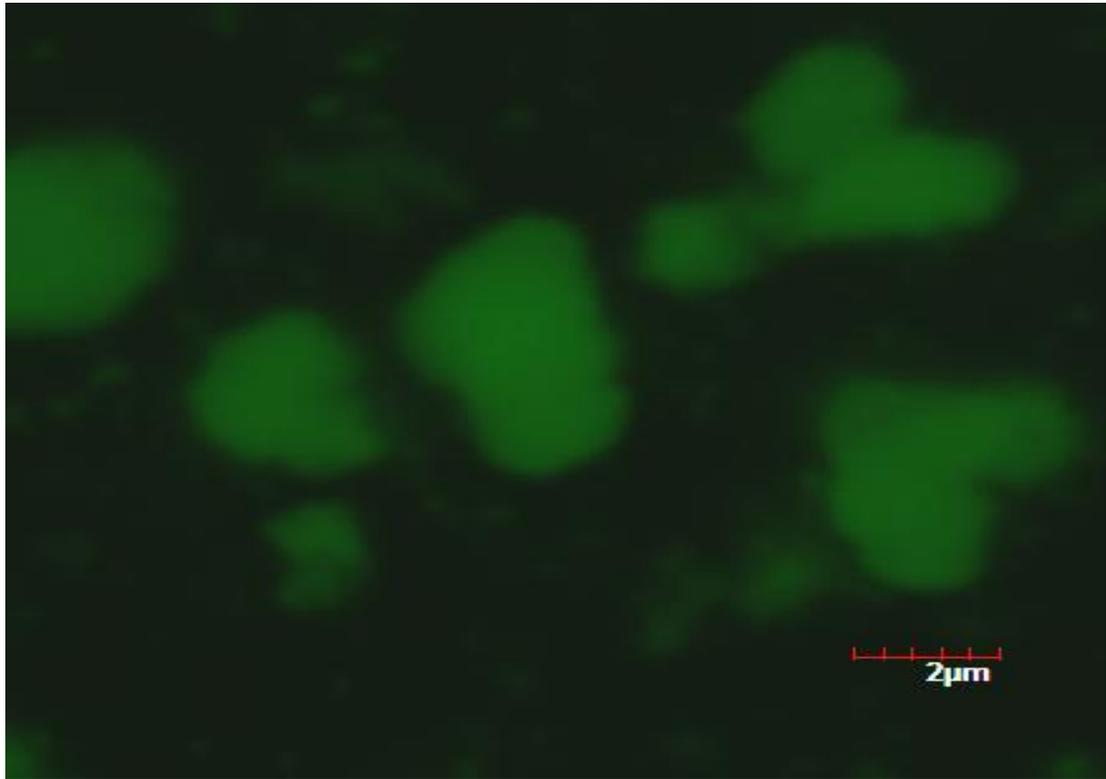


Fig. 9. Las estructuras PH110GFP son micropartículas tipo poliedra que contienen la GFP distribuida en toda la partícula. Las micropartículas PH110GFP fueron analizadas por medio de microscopía con fluorescencia previa purificación. La imagen muestra micropartículas verdes fluorescentes en con un tamaño de entre 0.5 y 2 µm.

Las micropartículas PH110GFP son fáciles de purificar

Para obtener las micropartículas PH110GFP, las células Sf-9 infectadas con el baculovirus PH110GFP, fueron sonicadas y purificadas como se mencionó previamente. La pureza de la proteína fue evaluada a través de un bioanalizador (Analitek) y SDS-PAGE.

El electroferograma obtenido del bioanalizador mostró una proteína de un peso molecular de 43 kDa aproximadamente y una relativa pureza (Fig. 10).

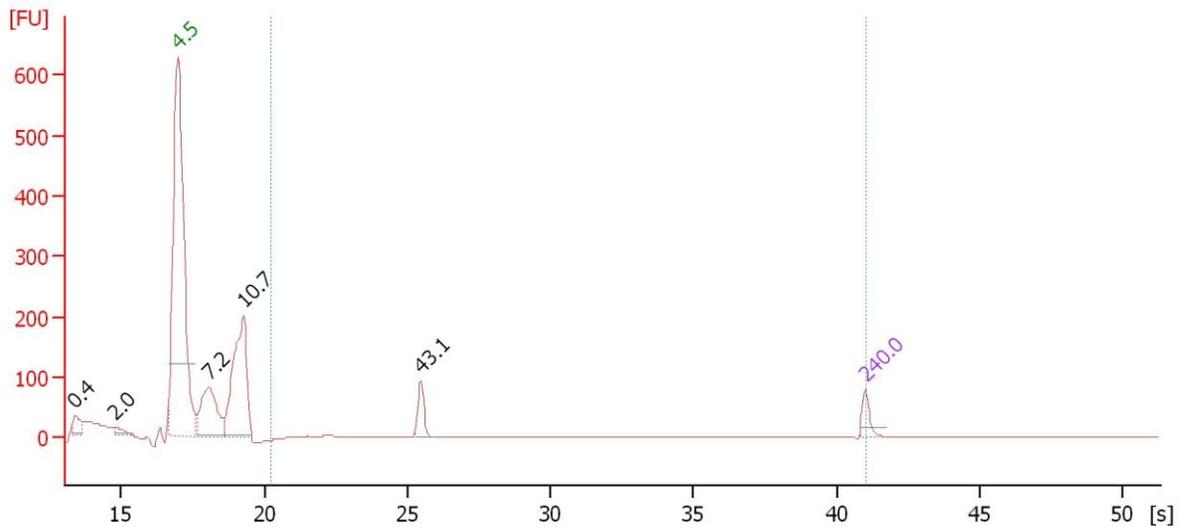


Fig. 10. Determinación de la pureza y peso molecular de las micropartículas PH110GFP por medio de un electroferograma utilizando un bioanalizador. Se muestran proteínas de bajo peso molecular, y una proteína de 43 kDa que aproximadamente corresponde con el peso de PH110GFP (41 kDa).

Para la SDS-PAGE, se cargaron 5 μg de cada proteína recombinante (micropartículas PH110GFP, GFPs de baculovirus y GFP_r de *E. coli*) previa semi-purificación y se corrieron por electroforesis. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie como previamente se describió. La GFP_r de *E. coli* en su forma comercial posee una cola de histidinas y es purificada con columnas de níquel. El peso esperado fue de 40.953 kDa para PH110GFP, de 28 kDa para la GFP_r de *E. coli* y de 27.125 kDa para GFPs producida con baculovirus. Las micropartículas PH110GFP muestran una relativa pureza. No se utilizaron filtros ni columnas para purificar la GFPs o las micropartículas PH110GFP. Todas las proteínas tuvieron el tamaño esperado (Fig.11).

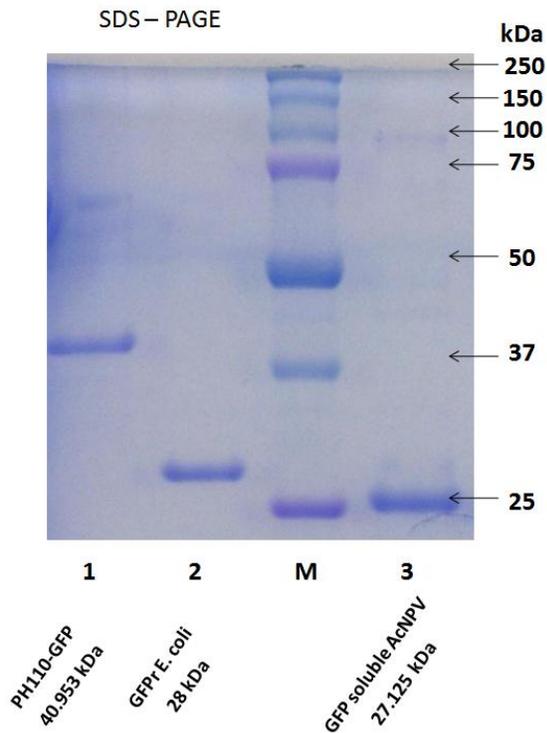


Fig. 11. Determinación de la pureza y peso molecular de las micropartículas PH110GFP, GFP recombinante (GFP_r) y GFP soluble (GFP_s). Las proteínas se analizaron por medio de SDS-PAGE. La expresión de las proteínas fue del tamaño esperado y se muestra una pureza relativa de todas las proteínas.

Detección de GFP en las micropartículas PH110GFP

Para la detección de la GFP en las micropartículas PH110GFP se realizó un western blot como se mencionó previamente. La película mostró la presencia de GFP en el sobrenadante de células Sf-9 infectadas con el baculovirus GFPs, con un peso de 27 kDa, y en las micropartículas PH110GFP con un peso de 41 kDa (Fig. 12).

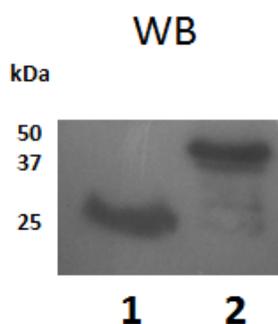


Fig. 12. Detección de GFP en sobrenadante de células infectadas con el baculovirus GFPs y en las micropartículas PH110GFP. La GFP se detectó en el sobrenadante de las células infectadas con el baculovirus GFPs que produce GFP soluble con un peso de 27 kDa (1); y en las micropartículas PH110GFP con un peso de 41 kDa (2) utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFP. Las proteínas se corrieron por SDS-PAGE y se detectaron por medio de western blot. Cada carril fue cargado con 5 µg de proteína.

Rendimiento de las micropartículas PH110GFP

La producción de las micropartículas PH110GFP fue más eficiente cuando las células se infectaron con una MOI de 10, y cuando se sonicaron entre las 72 y las 96 h utilizando una confluencia de la línea Sf-9 de 1×10^6 . El rendimiento de la proteína fue de más de 1 mg por cada 8 mL de suspensión de células Sf-9.

Las poliedras WT difieren de las micropartículas PH110GFP con respecto a su morfología

La SEM mostró que las poliedras WT son partículas con morfología regular y tamaño de 0.5 a 2 µm (Fig. 13). El péptido de 110 aa de poliedrina es capaz de formar estructuras en forma de poliedra, y presentan un tamaño similar a la poliedra WT, pero que difieren en cuanto a morfología (Fig. 14).

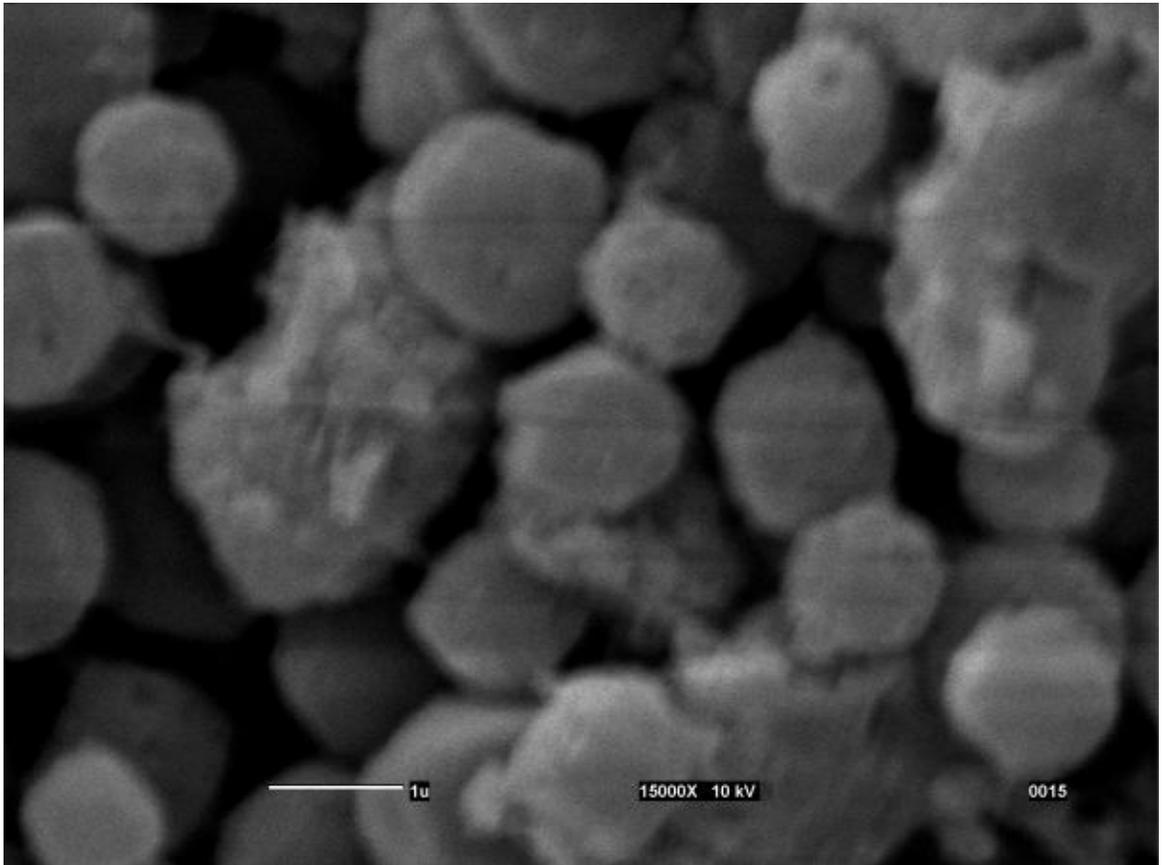


Fig. 13. Poliedras WT observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células Sf-9 fueron infectadas con baculovirus WT. 72 h post-infección, las células fueron sonicadas y purificadas. Las poliedras son cristales de proteína, con un tamaño y forma regular. La barra muestra 1 μ m.

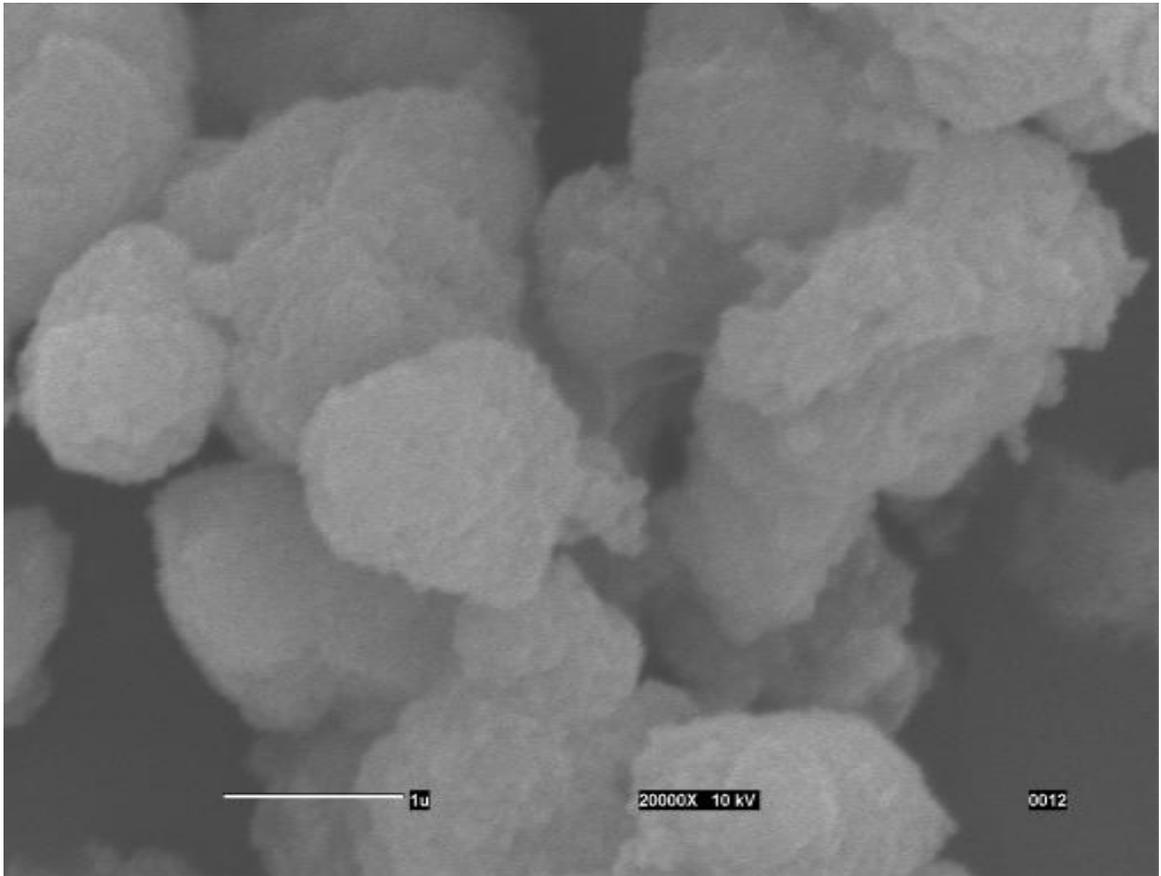


Fig. 14. Micropartículas PH110GFP observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células Sf-9 fueron infectadas con baculovirus PH110GFP, se sonicaron 72 h post-infección, y las micropartículas PH110GFP se purificaron por centrifugación. Estas micropartículas tienen forma de poliedra siendo también de tamaño similar, pero tienden a ser más irregulares. La barra muestra 1 μm .

Las micropartículas PH110GFP no contienen baculovirus ocluidos

Adicionalmente la TEM mostró que las micropartículas PH110GFP no contienen virus ocluidos en los cuerpos de oclusión (Fig. 15 – A y 15 – B) a comparación de la poliedra WT donde se observan los baculovirus ocluidos en las poliedras (Fig. 16 – A y 16 – B).

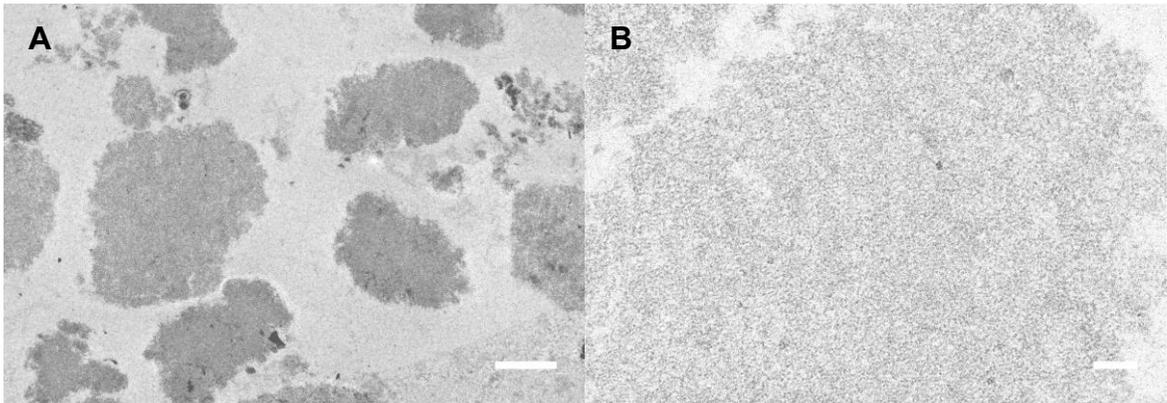


Fig. 15. Micropartículas PH110GFP analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). A) Corte de micropartículas PH110GFP con 90 nm de grosor y contrastadas con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. La barra representa 1 μ m. B) Acercamiento de la Fig. 15 – A. La barra representa 200 nm. No hay evidencia de baculovirus ocluidos en estas partículas.

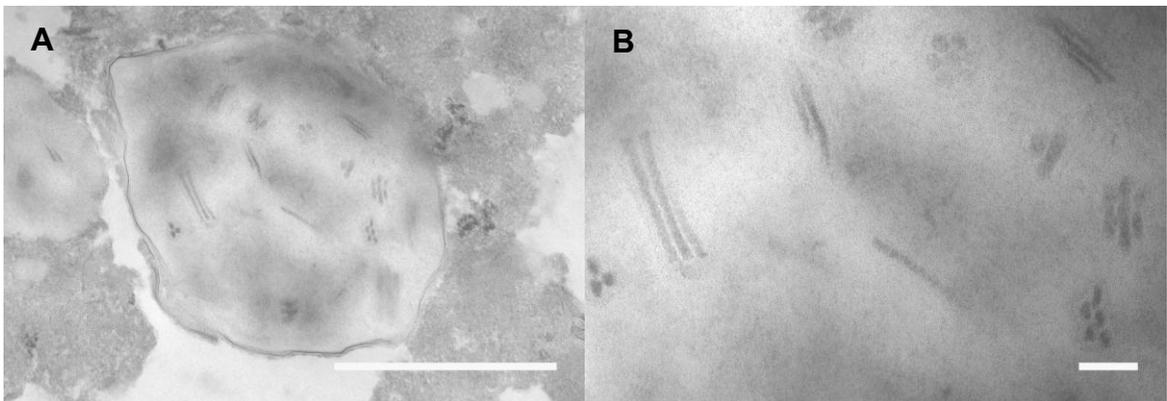


Fig. 16. Poliedras WT analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). A) Corte de poliedras WT con 90 nm de grosor y contrastadas con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. La barra representa 1 μ m. B) Acercamiento de la Fig. 16 – A. La barra representa 100 nm. Existe la presencia de gran cantidad de baculovirus ocluidos en las poliedras WT.

Las micropartículas PH110GFP producen anticuerpos anti-GFP de larga duración sin la administración de adyuvantes

Para determinar el efecto adyuvante de las micropartículas PH110GFP, los ratones se inmunizaron como se describió previamente y los sueros se recolectaron cada 2 semanas hasta la semana 16 (Fig. 17). La respuesta humoral contra la GFP fue más alta en los ratones que fueron inmunizados con las micropartículas PH110GFP en comparación con los ratones inmunizados con GFPs. Los ratones inmunizados con GFPs no produjeron una respuesta significativa de IgG anti-GFP. La inmunización de GFPs produjo una cantidad significativa de IgG solo con la co-administración de FCA e IFA. La duración de IgG anti-GFP fue similar en los ratones inmunizados con micropartículas PH110GFP con y sin adyuvante, y en los ratones inmunizados con la GFPs con la co-administración de adyuvantes, sin encontrar diferencias significativas entre estos tres grupos en este ensayo (Fig. 18). En todos los casos, la significancia estadística fue de $P < 0.05$.

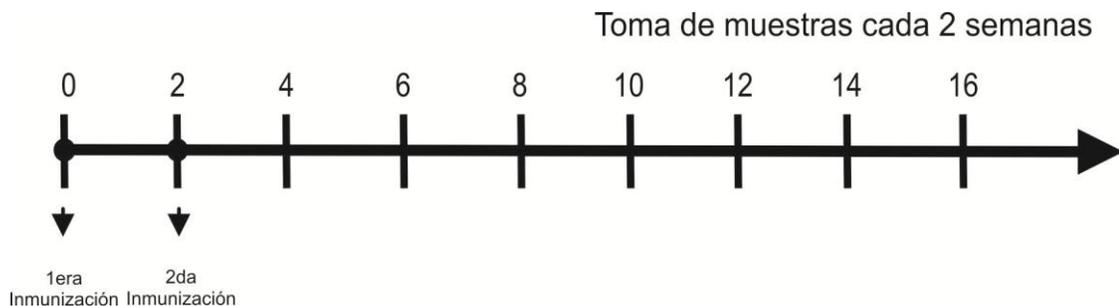


Fig. 17. Esquema de inmunización. Los ratones se inmunizaron al día 0 y dos semanas después. Los sueros se colectaron antes de la primera inmunización y hasta la semana 16.

La GFP integrada en partículas genera una respuesta

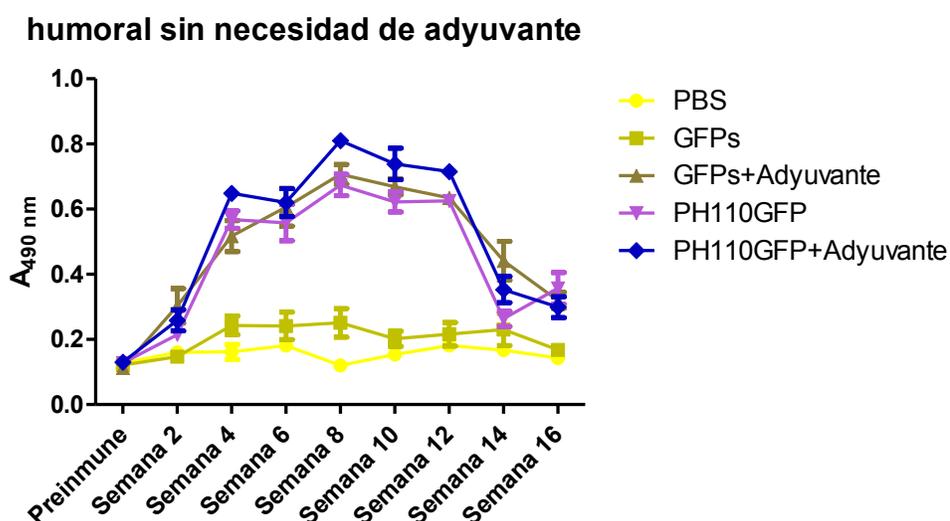


Fig. 18. Evaluación del efecto adyuvante y duración de la respuesta humoral de ratones inmunizados con las micropartículas PH110GFP. Se aplicó fosfato salino buferado (PBS) (●) y GFP soluble (GFPs) (■) como controles negativo y basal, respectivamente; GFPs con adyuvante completo e incompleto de Freund (FCA e IFA) (GFPs+adyuvante) (▲) y micropartículas PH110GFP con FCA e IFA (PH110GFP+Adyuvante) (◆) como control positivo y para evaluar la respuesta sinérgica, respectivamente; micropartículas PH110GFP sin adyuvante (PH110GFP) (▼) para evaluar el efecto adyuvante del péptido. Las micropartículas PH110GFP producen anticuerpos anti-GFP de manera significativa, e inducen una respuesta de similar duración a la obtenida con adyuvantes. La GFPs no es capaz de producir anticuerpos anti-GFP ($P < 0.05$). Las barras representan el error estándar. Para la lectura de las placas se utilizó un filtro de 490 nm.

Las micropartículas PH110GFP producen altos títulos de anticuerpos anti-GFP sin el uso de adyuvantes

Para calcular el título de anticuerpos por ELISA, se utilizó un protocolo descrito previamente. Éste se determina como aquella dilución de suero que resulta en 0.2 unidades de absorbancia arriba del fondo en el procedimiento de ELISA (Ausubel *et al.*, 2002b).

En la evaluación del efecto adyuvante, la aplicación de micropartículas PH110GFP produjo los niveles más altos de IgG anti-GFP a las 8 semanas (Fig.

18). En este periodo se alcanzaron altos títulos de anticuerpos anti-GFP cuando los ratones fueron inmunizados con micropartículas PH110GFP sin el uso de adyuvantes, aunque se obtuvieron títulos más altos cuando se aplicó la GFPs o las micropartículas PH110GFP, ambas proteínas en co-administración con adyuvantes (Fig. 19).

Título de anticuerpos anti-GFP alcanzados a la semana 8 post-inmunización

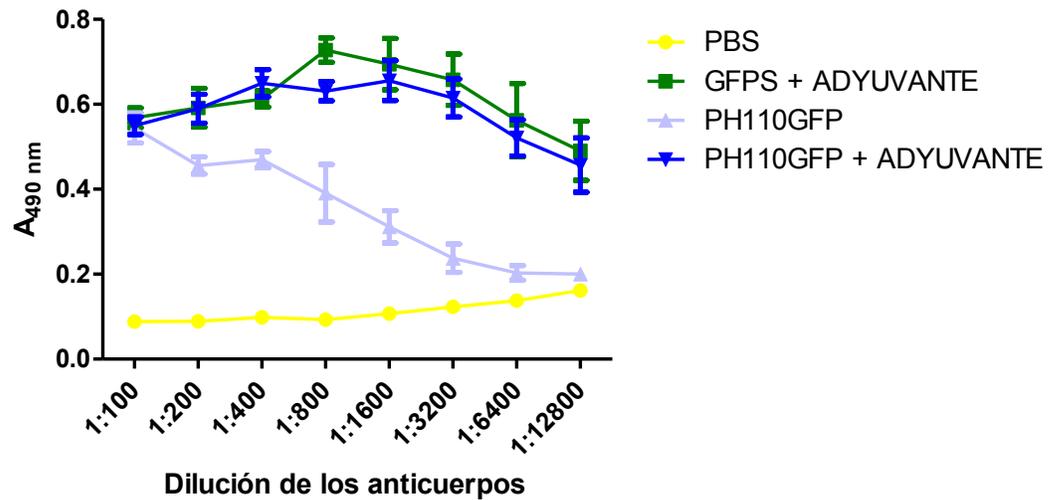


Fig. 19. Las micropartículas PH110GFP producen altos títulos de anticuerpos anti-GFP sin el uso de adyuvantes. Las micropartículas PH110GFP se aplicaron sin adyuvante (\blacktriangle) o con adyuvante completo e incompleto de Freund (FCA e IFA) (\blacktriangledown). Se utilizó la GFPs con FCA e IFA como control positivo (\blacksquare) y el PBS (\bullet) como control negativo. La aplicación de PH110GFP logró producir un título elevado de anticuerpos sin la co-administración de adyuvantes, aunque se alcanzaron títulos más altos cuando se aplicó FCA/IFA. No se observó ningún efecto sinérgico en PH110GFP con adyuvantes. La vía de inmunización fue intramuscular. Para la lectura de las placas se utilizó un filtro de 490 nm.

La aplicación de altas cantidades de micropartículas PH110GFP no mostró toxicidad, pero mostró una producción de anticuerpos dosis-dependiente

Para el estudio de toxicidad de las micropartículas PH110GFP, los ratones recibieron por vía IM altas cantidades de las micropartículas: 30, 70, 150, 300 y 600 μg por ratón. Durante un periodo de 10 semanas post-inmunización no se observaron reacciones secundarias como depresión, anorexia, pelo erizado, disnea, hiperventilación, edema o muerte en ninguno de los grupos. A la palpación del sitio de aplicación de las micropartículas PH110GFP no se detectó fibrosis.

Para conocer si la aplicación de micropartículas PH110GFP generaba títulos mayores de 1:500 con una sola aplicación, se tomaron sueros de los ratones utilizados en la prueba de toxicidad, antes y después de la inmunización a intervalos de 2 semanas y fueron analizadas con un ELISA indirecto. Se observó una respuesta humoral dependiente de la concentración del antígeno (Fig. 20).

Evaluación de la respuesta humoral de los ratones inmunizados con una sola dosis IM de PH110GFP

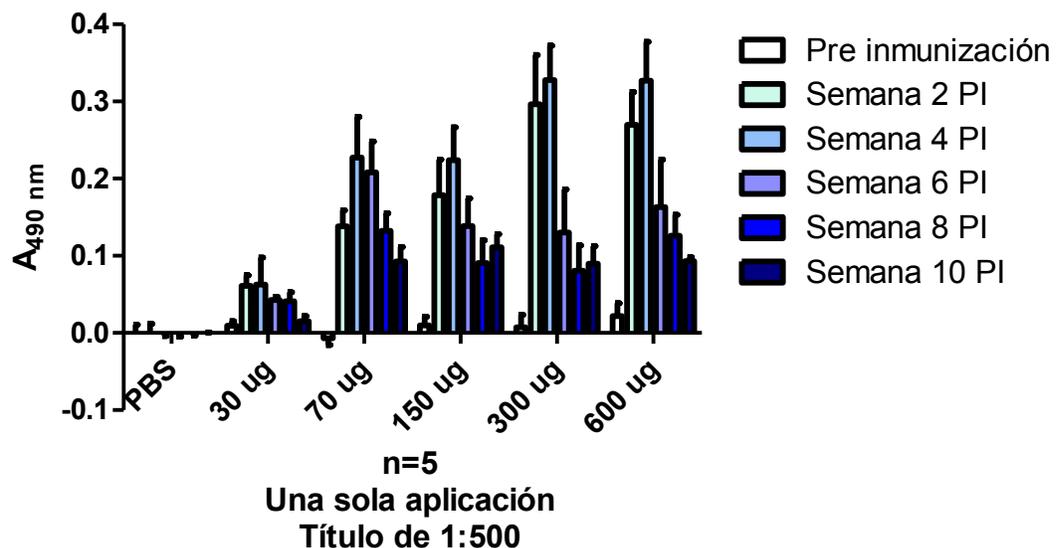


Fig. 20. Evaluación de la respuesta inmune humoral producida por una sola aplicación de micropartículas PH110GFP de 30, 70, 150, 300 y 600 μg . La cantidad de anticuerpos anti-GFP es dependiente de la dosis de micropartículas. Para la lectura de las placas se utilizó un filtro de 490 nm.

Discusión y conclusiones

El uso de vacunas es una de las herramientas más efectivas para controlar las enfermedades infecciosas. Hasta ahora las vacunas tradicionales se han empleado en la mayoría de casos (Akagi *et al.*, 2012). A diferencia de las vacunas recombinantes, las vacunas tradicionales no permiten diferenciar entre animales infectados y animales vacunados (Bhanuprakash *et al.*, 2009). Las vacunas inactivadas presentan una respuesta inmune limitada, y las vacunas atenuadas tienen el riesgo de recombinación o rearrreglos con virus de campo (Pena *et al.*, 2013).

Las vacunas recombinantes de subunidades son una nueva generación de vacunas basadas en la aplicación de una proteína viral o péptido que pueden contener tanto epitopos para células B como para células T y ofrecen ser alternativas efectivas a las vacunas tradicionales. (Arnon y Ben-Yedidia, 2003; Revisado por Noad y Roy, 2003). Sin embargo, es necesario saber que las vacunas de subunidades necesitan concentraciones más elevadas de antígeno para tener el mismo efecto protector que una vacuna de virus atenuado o inactivado, por lo que pueden ser más costosas para utilizarse en programas de vacunación; esto tiene impacto en salud humana, pero es particularmente significativo en el caso de vacunas de uso veterinario donde el costo de la vacuna debe evaluarse con respecto al valor del animal vacunado (Revisado por Noad y Roy, 2003).

Las vacunas en desarrollo basadas en subunidades purificadas o péptidos sintéticos son poco inmunogénicas y por lo general requieren del uso de adyuvantes (Akagi *et al.*, 2012). Muchos de los adyuvantes que se han desarrollado presentan toxicidad local o incapacidad de conferir protección óptima, y el único adyuvante aprobado en humanos y utilizado alrededor del mundo es el hidróxido de aluminio. Sin embargo, se ha observado que éste adyuvante puede

causar severas reacciones secundarias (Petrovsky y Aguilar, 2004; Rudra *et al.*, 2012). También se ha reportado el síndrome inflamatorio/autoinmune inducido por adyuvantes después de la vacunación, aunque es poco frecuente (Soriano *et al.*, 2014). Es por eso que es importante el desarrollo e investigación de nuevos adyuvantes que produzcan una fuerte respuesta inmune, pero con los mínimos efectos secundarios (Singh y O'Hagan, 2002).

Otro aspecto importante es la estabilidad de los antígenos. Las vacunas son productos biológicos sensibles al calor. La recomendación para almacenar vacunas es mantenerlas entre 2 y 8°C (Techathawat *et al.*, 2007). Muchas comunidades rurales de diversas partes del mundo no tienen acceso a refrigeradores, y se realizan esfuerzos para producir vacunas más estables (Hipgrave *et al.*, 2006).

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto adyuvante de un péptido de fusión basado en 110 aa de poliedrina que produce micropartículas. Se utilizó la GFP como antígeno en un modelo murino, y se determinó su efecto adyuvante por medio de un ELISA indirecto. Se seleccionó la poliedrina como vehículo, debido a que es una proteína que produce cristales proteicos para proteger a los virus de insecto en su interior, lo que resalta su elevada estabilidad, permitiendo en la naturaleza proteger a estos virus y sus proteínas del medio ambiente por décadas (Slack y Arif, 2007). Se seleccionó el péptido de 110 aa de poliedrina, debido a su estructura secundaria basada en dos láminas β plegadas y una hélice α con la capacidad de auto-ensamblarse y producir micropartículas, lo que facilita una relativa pureza, y por ser un péptido corto, permite un mayor rendimiento de las proteínas recombinantes, teniendo menos poliedrina y más proteína recombinante (Sampieri *et al.*, 2014) (datos en publicación).

En este estudio se comparó la respuesta humoral anti-GFP producida por la aplicación de micropartículas PH110GFP, con la respuesta producida por la aplicación de GFPs con FCA e IFA en ratones. El FCA es un potente adyuvante

que combina las propiedades inmunomoduladoras de *Mycobacterium tuberculosis* con el efecto “depósito” de las emulsiones agua/aceite (Cox y Coulter, 1997). El FCA promueve principalmente una respuesta Th1; mientras el IFA que no contiene micobacterias, promueve una respuesta Th2 (Yip *et al.*, 1999). Estos adyuvantes pertenecen al grupo de las partículas, pero también actúan como inmunoestimulantes. El IFA se utilizó en vacunas veterinarias y humanas obteniendo una respuesta humoral fuerte y duradera (Cox y Coulter, 1997).

En este trabajo, la inmunización de ratones utilizando micropartículas PH110GFP promovió un alto título de anticuerpos anti-GFP sin el uso de adyuvantes, lo que indica la capacidad adyuvante del péptido, y que estas micropartículas presentan el antígeno de manera adecuada. Como era de esperarse, la inmunización con GFPs solo produjo una fuerte respuesta humoral cuando se aplicó con adyuvantes, indicando que la GFP fue un buen modelo antigénico. La aplicación de micropartículas PH110GFP con adyuvantes no tuvo un efecto sinérgico.

Cuando se evaluó el efecto adyuvante, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo inmunizado con las micropartículas PH110GFP y los grupos donde se utilizaron adyuvantes, sugiriendo que la cantidad de anticuerpos era similar en los 3 grupos inmunizados (Fig. 18). Sin embargo, en la titulación de los anticuerpos se encontraron diferencias entre estos tres grupos, apuntando que la aplicación de micropartículas PH110GFP o GFPs, ambas con adyuvantes, resultaron promover títulos de anticuerpos más altos que las micropartículas sin adyuvantes; no obstante, los títulos que se alcanzaron con las micropartículas PH110GFP son muy prometedores (Fig. 19). Esta diferencia fue probablemente debida a una saturación del ensayo utilizado para la evaluación del efecto adyuvante, producida por elevadas concentraciones de anticuerpos anti-GFP.

Los animales que se inmunizaron con FCA e IFA desarrollaron fibrosis en el sitio de aplicación. En la prueba para determinar si las micropartículas PH110GFP

eran tóxicas, los ratones fueron inmunizados con altas cantidades de estas micropartículas, y monitoreados durante 10 semanas. A dosis de hasta 600 µg/ratón, no se observaron signos de toxicidad y a la palpación no se detectó edema ni fibrosis en ninguno de los ratones, lo que sugiere que la aplicación del péptido de poliedrina de 110 aa es seguro en mamíferos. Por otro lado, los animales inyectados con hasta 600 µg mostraron una respuesta humoral dependiente de la cantidad de antígeno, y un título de anticuerpos mayor a 1:500 (Fig. 20). Esto indica que se pueden utilizar altas dosis de micropartículas de poliedrina en las inmunizaciones, para alcanzar títulos de anticuerpos comparables con los que se alcanzan con los adyuvantes FCA e IFA, pero sin los efectos secundarios que se obtienen con la aplicación de dichos adyuvantes.

Actualmente los adyuvantes de uso común como el hidróxido y el fosfato de aluminio aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para uso en humanos han demostrado un perfil de seguridad por más de 6 décadas. La cantidad de aluminio va de 0.125 a 0.85 mg/dosis Sin embargo, el aluminio presenta ciertas limitantes como la producción de IgE y la incapacidad para promover una inmunidad celular (Baylor *et al.*, 2002). Es necesario comparar las micropartículas producidas por el péptido de 110 aa de poliedrina, con un adyuvante de uso común en la vacunación, como lo es el hidróxido de aluminio, evaluando la producción de IgE, los títulos de anticuerpos, y la respuesta CTL.

Para clasificar a las micropartículas de poliedrina, éstas estructuras podrían pertenecer a los adyuvantes particulados, y como sistemas de entrega de antígenos (delivery system), debido a la morfología, tamaño y estabilidad que presentan, ya que tienen la capacidad de presentar el antígeno de manera adecuada hacia las APCs, como lo reportan Singh y O'Hagan (2002).

La generación de partículas adyuvantes más potentes puede permitir el desarrollo de vacunas profilácticas, e incluso terapéuticas contra las enfermedades infecciosas (Akagi *et al.*, 2012). Es necesaria una completa caracterización inmunológica para conocer el tipo de células que toman estas estructuras tipo poliedras, así como las citocinas producidas, y por lo tanto determinar el tipo de inmunidad que producen (Th1, Th2 o ambas). Los resultados mostraron que al menos la respuesta Th2 puede estar involucrada.

Existen pocas investigaciones sobre el uso de péptidos como adyuvantes. Rudra *et al.* (2009) reportaron recientemente que al inmunizar ratones con un péptido de ovoalbúmina (OVA) fusionado a un péptido sintético que forma nanofibras (OVAQ11), se produjo una fuerte respuesta humoral anti-OVA sin el uso de adyuvantes, a diferencia de la inmunización con OVA soluble sin adyuvantes. En esta tesis, la inmunización con el péptido de 110 aa de poliedrina fusionado a GFP que forma micropartículas, de manera similar, produjo una respuesta humoral anti-GFP de manera significativa sin el uso de adyuvantes, en comparación con la inmunización con GFPs.

La microscopía confocal mostró que el péptido de 110 aa de poliedrina contiene un sitio de localización nuclear, por lo que las proteínas que se fusionan a este péptido son transportadas al núcleo de las células infectadas. La SEM y la microscopía confocal mostraron que la GFP fusionada al péptido de 110 aa de poliedrina, es capaz de producir micropartículas tipo poliedra. Esto facilita la purificación de la proteína fusionada al péptido, y por lo tanto, la purificación es económica y rápida, en comparación con otros sistemas donde se utilizan protocolos que tardan más tiempo, y costosas columnas de purificación.

El tamaño de las partículas es fundamental en la respuesta inmune (Akagi *et al.*, 2012). Los macrófagos son capaces de fagocitar partículas muy pequeñas (<5µm) mientras las partículas de grandes tamaños inducen al formación de células gigantes de cuerpo extraño (Anderson *et al.*, 2008). El tamaño de las

partículas puede variar, habiendo nanopartículas que pueden ir de 10 a 1000 nm y micropartículas que pueden ir de 1 a 100 μm . Muchas partículas están formadas de polímeros biodegradables, frecuentemente de PLG (Cox y Coulter, 1997).

El efecto adyuvante de las partículas parece ser una consecuencia de la absorción en las DCs. Los antígenos en partículas han mostrado ser más eficientes que los antígenos solubles para la inducción de la respuesta inmune (Harding y Song, 1994). Esto concuerda con nuestros resultados, donde la aplicación de GFPs no produjo una respuesta humoral significativa, a comparación de la aplicación de las micropartículas PH110GFP, donde se alcanzaron altos títulos de anticuerpos, recalando que el tamaño del antígeno es muy importante y que las APCs pueden tomar más eficientemente las micropartículas, en comparación con los antígenos solubles.

Actualmente muchas investigaciones se basan en nanopartículas que contienen antígenos encapsulados, inmovilizados o adsorbidos en la superficie como alternativas al aluminio, y tienen el objetivo de desarrollar mejores sistemas de vacunación y minimizar la frecuencia de inmunización, y como ejemplo están las nanopartículas de PLG. Sin embargo, la eficiencia del encapsulamiento ha sido muy baja, aunque la estabilidad de la proteína cuando es encapsulada como solida en vez de líquida, es más eficiente (Akagi *et al.*, 2012). Los resultados de esta investigación, utilizando la microscopía confocal, mostraron que la GFP está presente en toda la micropartícula. Cabe mencionar que cada péptido de 110 aa de poliedrina, contiene un antígeno, por lo que el rendimiento es mayor, y los costos de producción se reducen.

Otras cuestiones de gran importancia en la elaboración de vacunas son el rendimiento y la producción de proteínas de manera más rápida y a bajo costo. Estos son los factores más importantes a considerar en muchos laboratorios (Aydin *et al.*, 2012). Utilizando el potente promotor de poliedrina y un péptido corto para formar micropartículas tipo poliedra (PH110GFP), se puede obtener más de 1

mg de proteína total, en menos de 10 mL de células de insecto con una confluencia de 1×10^6 cuando se sonicán entre 72 y 96 h PI; una cantidad bastante considerable, que además puede ser mejorada, lo que en este aspecto se posiciona sobre las células de mamífero, provenientes de líneas celulares cancerosas y con poco rendimiento.

Otra característica que identifica las micropartículas de poliedrina, es que no poseen químicos (formol, timerosal, adyuvantes, etc.), y no poseen el riesgo de recombinación o reversión como las vacunas atenuadas. En adición, la TEM señaló que las micropartículas PH110GFP no contienen virus a diferencia de la poliedra WT. Aunque la aplicación de baculovirus en mamíferos es segura, y no se ha podido demostrar que estos virus infecten células de mamífero, es recomendable realizar PCR para determinar si existe la presencia de DNA viral.

Básicamente la única limitante apreciable es el tiempo en la construcción del baculovirus recombinante que expresa el antígeno, y a veces, la selección del gen o péptido candidato para elaborar una vacuna. El gen candidato debe ser análogo a la proteína producida por el virus de campo, que sea indispensable en el proceso de infección, como proteínas de unión o de fusión de membranas, o bien, un análogo de alguna toxina que ofrezca la capacidad de estimular al sistema inmune para neutralizarla. Es importante que la proteína o péptido posea epitopos tanto para células B como para células T, disparando la producción de anticuerpos neutralizantes que bloquean la infección viral y, por otro lado, activando linfocitos T citotóxicos con la capacidad para lisar células infectadas. El sistema de expresión de antígenos fusionados al péptido de poliedrina de 110 aa también puede asistir en la producción de vacunas marcadoras para diferenciar los animales enfermos de los animales vacunados, basándose solo en subunidades de los patógenos.

El sistema baculovirus es muy prometedor y en la actualidad ya hay vacunas derivadas de este sistema que han sido aprobadas por la FDA, como Flublok®, una vacuna de subunidades de HA utilizada contra la influenza, y Cervarix®, una VLP utilizada contra el virus de papiloma humano (Yang, 2013). Flublok® es una vacuna trivalente que contiene 135 µg de HA por dosis y ha mostrado ser bien tolerada e inmunogénica (Cox y Hollislyter, 2009).

Al utilizar el péptido de 110 aa de poliedrina, los antígenos llevan una señal que les permite ser incorporados en la poliedra completa (Sampieri *et al.*, 2014) (datos en publicación). Esta característica podría prevenir la degradación del antígeno oculto, por lo que es muy posible que no sea necesario el uso de refrigerantes para preservar las vacunas recombinantes, y por lo tanto las vacunas se podrían utilizar en comunidades donde es difícil el transporte y/o uso de refrigerantes.

Finalmente, en este trabajo, se concluye que la fusión de antígenos al péptido de 110 aa de poliedrina capaz de formar micropartículas, presenta las siguientes ventajas: producción de una cantidad elevada de proteína recombinante, purificación fácil, rápida y económica. Estas partículas no son tóxicas, son orgánicas y biodegradables, no poseen formol, timerosal, ni adyuvantes, y no producen inflamación aparente como en el caso de algunos adyuvantes que producen inflamación severa e incluso fibrosis en el sitio de aplicación. Esta investigación fue una prueba de concepto basada en vacunas subunitarias, y por lo tanto este sistema no tiene las desventajas de reversión o recombinación como en el caso de las vacunas clásicas, y pueden servir también para la producción de vacunas marcadoras, para diferenciar entre animales vacunados e infectados.

Las partículas producidas por el péptido de 110 aa de poliedrina, pueden ser consideradas como un nuevo adyuvante particulado, resaltando: la estabilidad de la poliedrina y su efecto adyuvante, colocando a estas partículas de poliedrina

en un posible candidato para ser utilizado como una plataforma para la producción de vacunas a gran escala. Es necesaria una caracterización inmunológica más amplia y detallada para determinar si este sistema genera una respuesta Th1 o Th2, así como evaluar el sistema con antígenos de patógenos.

Abreviaturas

µg: microgramo(s)

µL: microlitro(s)

µm: micrometro (s)

aa: aminoácido(s)

AcNPV [*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus]: virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*

ANOVA: Análisis de varianza

APCs [Antigen presenting cells]: células presentadoras de antígenos

bp [Base pairs]: pares de bases

BVs [Budded virus]: virión libre

CpG: Adyuvante elaborado con DNA de una cadena rico en guaninas-citocinas

CTL [Cytotoxic T lymphocytes]: linfocitos T citotóxicos

DAMPs [Damage associated molecular patterns]: patrones moleculares asociados a daño

DCs: [Dendritic cells] células dendríticas

DIPs: [Defective-interfering particles]: partículas defectuosas interferentes

DNA [Deoxyribonucleic acid]: ácido desoxirribonucleico

ELISA [Enzyme linked immunosorbent assay]: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ER [Endoplasmic reticulum]: retículo endoplásmico

FCA [Freund's complete adjuvant]: adyuvante completo de Freund; emulsión de agua con aceite que contiene micobacterias lisadas

FDA [Food and Drug Administration]: Administración de Alimentos y Medicamentos

g: gramo(s)

GFP [Green fluorescent protein]: proteína verde fluorescente

GFP_r: GFP recombinante producida en *E. coli*

GFP_s: GFP soluble

Gp64: proteína de membrana de los baculovirus libres

GV: granulovirus

H: hora (s)

HA: hemaglutinina

IFA [Incomplete Freund's adjuvant]: adyuvante incompleto de Freund; emulsión de agua con aceite sin micobacterias

IFN: interferón

Igs: Inmunoglobulina(s) o anticuerpos(s)

IM: intramuscular

ISCOMs [Immunostimulating complex]: complejos inmunoestimulantes

J: joule(s)

LPS: lipopolisacáridos

MHC: [Major histocompatibility complex] complejo mayor de histocompatibilidad

min: minuto (s)

mL: mililitro

MNC: membrana de nitrocelulosa

MOI: [Multiplicity of infection]: multiplicidad de infección

nm: nanometros

OBs [Occluded bodies]: cuerpos de oclusión

ODV [Occluded derived virus]: virus ocluidos en la poliedra

OVA: ovoalbúmina

OVAQ11: péptido sintético fusionado a ovoalbúmina con capacidad adyuvante

PAMPs: [Pathogen associated molecular patterns] patrones moleculares asociados a patógenos

PBS [Phosphate saline buffer]: amortiguador isotónico de fosfatos

PBSM: PBS con leche al 2%

PBST: buffer de fosfatos mas tritón al 0.2%

PCs [Plasmatic cells]: células plasmáticas

PH110GFP: GFP fusionada a un péptido de 110 aa de poliedrina de *AcNPV*

PI: post infección

PIFS [Per os infectivity factors]: factores de infectividad *per os* (vía oral)

Poliedrina: proteína básica estructural producida en células infectadas por baculovirus para formar cuerpos de oclusión

PRRs [Pattern recognition receptors]: receptores de reconocimiento de patrones

RNA [Ribonucleic acid]: ácido ribonucleico

RPM: revoluciones por minuto

SDS-PAGE [Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis]: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SEM [Scanning electron microscope]: microscopía electrónica de barrido.

Sf-9: línea celular del insecto *Spodoptera frugiperda*

TBS: tris buffer salino

TBSM: TBS mas leche al 5%

TBST: TBS mas Tween al 0.1%

TCD4⁺: linfocitos T cooperadores

TCD8⁺: linfocitos T citotóxicos

TEM [Transmission electron microscope]: microscopía electrónica de transmisión.

Th0: [Naïve T helper cells]: linfocitos T cooperadores precursores

Th1: [T helper cells type 1]: linfocitos T cooperadores tipo 1

Th2: [T helper cells type 2]: linfocitos T cooperadores tipo 2

TLRs [Toll like receptors]: receptores tipo toll

TMB: tetrametilbencidina

VLPs [Virus like particles]: partículas tipo virus

WT: [Wild Type] Tipo silvestre; que se encuentra en la naturaleza

x g: gravedad; magnitud utilizada en centrifugación

Referencias

1. Akagi, T.; Baba, M.; Akashi, M. 2012. Adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Adv Polym Sci* 247 31–64
2. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 783 – 801
3. Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Sem immunol* 20 (2) 86–100
4. Arnon, R. and Ben-Yedidia, T. 2003. Old and new vaccine approaches. *Int Immunopharmacol* 3 1195 – 1204
5. Assenberg, R.; Wan, P. T.; Geisse, S.; Mayr, L. M. 2013. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opin Struct Biol* 23 393 – 402
6. Ausubel, F. M. et al. 2002. *Short Protocols in Molecular Biology: a compendium in methods from current protocols in molecular biology*. Fifth edition. Vol. 1. 11.3 Immunization of mice. 11 – 12
7. Ausubel, F. M. et al. 2002. *Short Protocols in Molecular Biology: a compendium in methods from current protocols in molecular biology*. Fifth edition. Vol. 1. 11.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. 11 – 6, 11 – 7
8. Aydin, H., Azimi, F. C., Cook, J. D., Lee, J. E. 2012. A Convenient and General Expression Platform for the Production of Secreted Proteins from Human Cells. *J Vis Exp* (65), e4041
9. Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., López-Ferber, M., and Possee, R. D. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* 202 586 – 605
10. Babensee J. E.; Paranjpe A. 2005. Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *J Biomed Mater Res A*. 74 (4) 503 – 10
11. Babensee, J. E. 2008. Interaction of dendritic cells with biomaterials. *Sem Immunol* 20 (2) 101–8.

12. Baylor, N. W.; Egan, W.; Richman, P. 2002. Aluminium salts in vaccines – US perspective. Vaccine S18 – S23
13. Bennewitz, N. L.; Babensee, J. E. 2005. The effect of the physical form of poly(lactic–coglycolic acid) carriers on the humoral immune response to co-delivered antigen. Biomaterials 26 2991–9.
14. Bhanuprakash, V.; Indrani, B. K.; Hosamani, M.; Balamurugan, V.; Singh, R. K. 2009. Bluetongue vaccines: the past, present and future. Expert Rev Vaccines. 8 (2) 191 – 204
15. Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. 1991. Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. J Virol 58 20-5827
16. Blissard, G. W. and Wenz, J. R. 1992. Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion J Virol 66 (11) 6829 – 6835
17. Braunagel, S. C. and Summers, M. D. 1994. Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. Virol 202; 315 – 328
18. Chen, Y.; Guo, W.; Xu, Z.; Yan, Q.; Luo, Y.; Shi, Q.; Chen, D.; Zhu, L.; Wang, X. 2011. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine. Virol J 8 307
19. Chen, J.; Pompano, R. R.; Santiago, F. W.; Maillat, L.; Sciammas, R.; Sun, T.; Han, H.; Topham, D. J.; Chong, A. S.; Collier, J. H. 2013. The use of self-adjuvanting nanofiber vaccines to elicit high –affinity B cell responses to peptide antigens without inflammation. Biomaterials 34 8776 – 8785
20. Chernomordik, L.; Leikina, E.; Cho, M. S.; Zimmerberg, J. 1995. Control of baculovirus gp64 induced syncytium formation by membrane lipid composition. J Virol 69 (5) 3049 – 3058
21. Cox, J. C. and Coulter, A. R. 1997. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. Vaccine. 15 (3) 248 – 256
22. Cox, M. M. J. and Hollister, J. R. 2009. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. Biologicals 37: 182 – 189
23. Diminsky, D.; Moav, N.; Gorecki, M.; Barenholz, Y. 2000. Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. Vaccine 18 3 – 17

- 24.**Edwards, M. J. and Dimmock, N. J. 2001. A haemagglutinin (HA1)-specific FAb neutralizes influenza A virus by inhibiting fusion activity. *J Gen Virol* 82 1387 – 1395
- 25.**Fredriksen, B. N. and Grip, J. 2012. PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Vaccine* 30 656 – 667
- 26.**Gheysen, D.; Jacobs, E.; de Foresta, F.; Thririari, C.; Francotte, M.; Thines, D.; de Wilde, M. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor PR55gag virus like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 59 103-112
- 27.**Golde, W. T.; Gollobin, P.; Rodriguez, L. L. 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34 (9) 39 – 43
- 28.**Harding, C. V. and Song, R. 1994. Phagocytic Processing of Exogenous Particulate Antigens by Macrophages for Presentation by Class I MHC Molecules. *J Immunol* 153 4925
- 29.**Harding, F. A.; McArthur, J. G.; Gross, J. A.; Raulet, D. H.; Allison, J. P. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356 (6370) 607-9
- 30.**Harrison, R. L. and Jarvis, D. L. 2006. Protein N-glycosylation in the baculovirus–insect cell expression system and engineering of insect cells to produce “mammalianized” recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res* 68 160 – 190
- 31.**Haas-Stapleton, E. J.; Washburn, J. O.; Volkman, L. E. 2004. P74 Mediates Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *J Virol* 78 (13) 6786 – 6791
- 32.**Hipgrave, D. B.; Tran, T. N.; Huong, V. M.; Dat, D. T.; Nga, N. T.; Long, H. T.; Van, N. T.; Maynard, J. E.; Biggs, B. A. 2006. *Am J Trop Med Hyg* 74 (2) 255 – 260
- 33.**Hoebe, K.; Janssen, E.; Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat immunol* 5 (10) 971 – 974
- 34.**Horton, H. M., and Burand, J. P. 1993. Saturable Attachment Sites for Polyhedron-Derived Baculovirus on Insect Cells and Evidence for Entry via Direct Membrane Fusion. *J Virol* 67 (4) 1860-1868

- 35.**Huang, J., Craggs, T. D., Christodoulou, J., & Jackson, S. E. (2007). Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP. *J Mol Biol* 370 (2) 356–71
- 36.**Izurieta, H. S.; Zuber, P.; Bonhoeffer, J.; Chen, R. T.; Sankohg, O.; Laserson, K. F.; Sturkenboom, M.; Loucq, C.; Weibel, D.; Dodd,C.; Black, S. 2013. Roadmap for the international collaborative epidemiologic monitoring of safety and effectiveness of new high priority vaccines. *Vaccine* 31 3623 – 3627
- 37.**Joosten, C. E. and Shuler, M. J. 2003. Production of a Sialylated N-Linked Glycoprotein in Insect Cells: Role of Glycosidases and Effect of Harvest Time on Glycosylation. *Biotechnol Prog* 19 193-201
- 38.**Kamita, S. G., Maeda, S., and Hammock, B. D. 2003. High-Frequency Homologous Recombination between Baculoviruses Involves DNA Replication. *J Virol* 77 (24) 13053–13061
- 39.**Kawai, T and Akira, S. 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17 338 – 334.
- 40.**Ke, J., Wang, J., Deng, R., and Wang, X. 2008. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac66 is required for the efficient egress of nucleocapsids from the nucleus, general synthesis of preoccluded virions and occlusion body formation. *Virol* 374 (2), 421–31
- 41.**Kim, B. Y.; Lee, K. S.; Sohn, M. S.; Woo, S. D.; Yoo, S. S.; Je, Y. H.; Jin, B. R. 2012. Production of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus envelope glycoproteins gB and gC as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *J Asia-Pacific Entomol* 15 114-120
- 42.**Kitajima, M; Hamazaki, H; Miyano-Kurosaki, N.; Takaku, H. 2006. Characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 378–384
- 43.**Kool, M.; Fierens, K.; Lambrecht; B. N. 2012. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest Adjuvant. *J Med Microbiol* 61 927–934
- 44.**Kost, T. A and Condreay, J. P. 2002. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *TRENDS Biotechnol* 20 (4) 173 – 180
- 45.**Kou, P. M.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D.; Babensee, J. E. 2011. Dendritic cell responses to surface properties of clinical titanium surfaces. *Acta Biomater* 7 1354–1363

- 46.** Kulakosky, P. C.; Hughes, P. R.; Wood, H. A. 1998. N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* 8 (7) 741–745
- 47.** Kulakosky, P. C.; Shuler, M. L. and Wood, H. A. 1998. N-glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in three insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 34:101-108
- 48.** Lanzavecchia, A and Sallusto, F. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106 263 – 266
- 49.** Lee, K. S.; Sohn, M. R.; Kim, B. Y.; Choo Y. M.; Woo, S. D.; Yoo, S. S.; Je, Y. H.; Choi, J. Y.; Roh, J. Y.; Koo, H. N.; Jin, B. R. 2012. Production of Classical Swine Fever Virus Envelope Glycoprotein E2 as Recombinant Polyhedra in Baculovirus-Infected Silkworm Larvae. *Mol Biotechnol* 50 211–220
- 50.** Lindley, K. M.; Su, J. L.; Hodges, P. K.; Wisely, G. B.; Bledsoe, R. K.; Condreay, J. P.; Winegar, D. A.; Hutchins, J. T.; Kost, T. A. 2000. Production of monoclonal antibodies using monoclonal baculovirus displaying gp64 – fusion proteins. *J Immunol Meth* 234 123 – 135
- 51.** Liu, Y. J. 2001 Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptative Immunity. *Cell* 106 259 – 262
- 52.** Lopez, C. B.; Moltedo, B.; Alexopoulou, L.; Bonifaz, L.; Flavell, R. A.; Moran, T. M. 2004. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *J Immunol* 173 6882–6889
- 53.** López, J. A.; Brennan, A. J.; Whisstock, J. C.; Voskoboinik, I.; Trapani, J. A. 2012. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 33 (8) 406–412
- 54.** Lu, A., and Carstens, E. B. 1991. Nucleotide Sequence of a Gene Essential for Viral DNA Replication in the Baculovirus Autograph californica Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* 181 336–347
- 55.** Luz-Madrigal, A. 2008. Generación de baculovirus modificados para la transferencia de material genético de forma selectiva en células de mamíferos. Tesis doctoral. Programa de doctorado en ciencias biomédicas-UNAM

- 56.** MacLeod, M. K. L.; McKee, A. S.; David, A.; Wang, J.; Mason, R.; Kappler, J. W.; Marrack, P. 2011. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *PNAS* 18 (19) 7914 – 7919
- 57.** Mallajosyula, J. K.; Hiatt, E.; Hume, S.; Johnson, A.; Jeevan, T.; Chikwamba, R.; Pogue, G. P.; Bratcher, B.; Haydon, H.; Webby, R. J.; McCormick, A. A. 2013. Single-dose monomeric HA subunit vaccine generates full protection from influenza challenge. *Hum Vaccin Immunother* 10 (3) 586 – 595
- 58.** Mata, E.; Igartua, M.; Hernández, R. M.; Rosas, J. E.; Patarroyo, M. E.; Pedraz, J. L. 2010. Comparison of the adjuvanticity of two different delivery systems on the induction of humoral and cellular responses to synthetic peptides. *Drug Deliv* 17 (7) 490 – 499
- 59.** Mata, E.; Carcaboso, A. M.; Hernández, R. M.; Igartua, M.; Corradín, G.; Pedraz, J. L. 2007. Adjuvant activity of polymer microparticles and montanide ISA 720 on immune responses to *Plasmodium falciparum* MSP2 long synthetic peptides in mice. *Vaccine* 25 877 – 885
- 60.** Mbow, M. L., De Gregorio, E.; Valiante, N. M.; Rappuoli, R. 2010. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* 22 411–416
- 61.** McCarthy, C. B., and Theilmann, D. a. 2008. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology* 375 (1), 277–91
- 62.** McKenna, K.; Beignon, A. S.; Bhardwaj, N. 2005. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Virol* 79 (1) 17 – 27
- 63.** Mellman, I. and Steinman, R. M. 2001. Dendritic cells specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106 255 – 258
- 64.** Meneses-Ruiz, D. M.; Lacleste, J. P.; Aguilar-Díaz, H.; Hernández-Ruiz, J.; Luz-Madrigal, A.; Sampieri, A.; Vaca, L.; Carrero, J. C. 2011. Mucosal Delivery of ACNPV Baculovirus Driving Expression of the Gal-Lectin LC3 Fragment Confers Protection against Amoebic Liver Abscess in Hamster. *Int J Biol Sci* 7 (9) 1345-1356
- 65.** Moens, L. and Tangye, S. G. 2014. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation: IL-21 takes center stage. *Front Immunol* 5 (65) 1 – 13

66. Mogensen, T. H. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 22 (2) 240 – 273
67. Monsma, S. A., and Blissard, G. W. 1995. Identification of a Membrane Fusion Domain and an Oligomerization Domain in the Baculovirus GP64 Envelope Fusion Protein. *J Virol* 69(4), 2583–2595
68. Noad, R. and Roy, P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *TRENDS Microbiol* 11 (9) 438 – 444
69. Noe, W.; Bux, R.; Berthold, W.; Werz, W. 1994. Optimization of vaccine production for animal health. *Cytotechnology* 15:169 – 176
70. Norton, L. W.; Park, J.; Babensee, J. E. 2010. Biomaterial adjuvant effect is attenuated by anti-inflammatory drug delivery or material selection. *J. Control Release*. 146 (3) 341–348
71. O'Neill, L. A. G.; Golenbock D.; Bowie, A. G. 2013. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Rev Immunol* 13 453 – 460
72. Oomens, A. G. P.; Monsma, S. A.; Blissard, G. W. 1995. The baculovirus GP64 envelope fusion protein: syntesi, oligomerization, and processing. *Virology* 209 592 – 603
73. Oomens, A. G. P., and Blissard, G. W. 1999. Requirement for GP64 to Drive Efficient Budding of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Virology* 254 297–314
74. Payne, C. C. and Kalmakoff, J. 1978. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification, and properties. *J Virol* 26 (1)84 – 92
75. Pena, L.; Sutton, T.; Chockalingam, A.; Kumar, S.; Angel, M.; Shao, H.; Chen, H.; Li, W. 2013. Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated. *J Virol* 87 (9) 5118 – 5127
76. Petrovsky, N. and Aguilar, J. C. 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82 488 – 496
77. Pomeranz, L. E.; Reynolds, A. E.; Hengartner, C. J. 2005. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (3) 462 – 500
78. Pomorska-Mól, M and Markowska-Daniel, I. 2010. Interferon- γ secretion and proliferative responses of peripheral bloodmononuclear cells after vaccination of pigs against Aujeszky's disease in the presence ofmaternal immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58 405–411

- 79.**Ribeiro, B. M.; Generino, A. P. M.; Acacio, C. N. L.; Kalapothakis, E.; B ao., S. N. 2009. Characterization of a new *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) polyhedra mutant. *Virus Res* 140 1–7
- 80.**Rodríguez-Calvo T.; Ojosnegros, S.; Sanz-Ramos, M.; García-Arriaza, J.; Escarm s, C.; Domingo, E.; Sevilla, N. 2010. New vaccine design based on defective genomes that combines features of attenuated and inactivated vaccines. *PLoS ONE* 5 (4)
- 81.**Rohrman, G. F. 1986. Polyhedrin structure. *J Gen Virol* 67 1499 – 1513
- 82.**Rudra, J. S.; Mishra, S.; Chong, A. S.; Mitchell, R. A.; Nardin, E. H.; Nussenzweig, V.; Collier, J. H. 2012. Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope. *Biomaterials* 33 6476 – 6484
- 83.**Rudra, J. S.; Tian, Y. F.; Jung, J. P.; Collier, J. H. 2010. A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *PNAS* 107 (2) 622 – 627
- 84.**Sabouri, A.H.; Marcondes, M. C. G.; Flynn, C.; Berger, M.; Xiao, N.; Fox, H. S.; Sarvetnick, N. E. 2014. TLR signaling controls lethal encephalitis in WNV-infected brain. *Brain Res* 1574 84 – 95
- 85.**Seo, H. W.; Lee, J.; Han, K.; Park, C.; Chae C. 2014. Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines. *Res Vet Sci* 97 (1) 38 – 42
- 86.**Singh, M. and O’Hagan, D. T. 2002. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 19 (6)715 – 728
- 87.**Slack, J. and Arif, B. M. 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res* 69 99 – 165
- 88.**Soriano, A.; Neshher, G.; Shoenfeld, Y. 2014. Predicting post-vaccination autoimmunity: Who might be at risk? *Pharm Res* 27341 – 27345
- 89.**Sparks, W. O., Rohlfing, A., and Bonning, B. C. 2011. A peptide with similarity to baculovirus ODV-E66 binds the gut epithelium of *Heliothis virescens* and impedes infection with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 92 (Pt 5), 1051–60
- 90.**Szatmary, Z. 2012. Molecular biology of toll-like receptors. *Gen. Physiol Biophys* 31 357–366

- 91.**Tami, C.; Peralta, A.; Barbieri, R.; Berinstein, A.; Carrillo, E.; Taboga, O. 2004. Immunological properties of FMDV-gp64 fusion proteins expressed on SF9 cell and baculovirus surfaces. *Vaccine* 840 – 845
- 92.**Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., and Matsuura, Y. 2001. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279(1) 343 – 53
- 93.**Techathawat, S.; Varinsathien, P.; Rasdjarmreansook, A.; Tharmaphornpilas, P.. 2007. Exposure to heat and freezing in the vaccine cold chain in Thailand. *Vaccine* 25 1328 – 1333
- 94.**Timm, E. A.; McLean, I. W.; Kupsky, Jr. C. H.; Hook, A. E. 1956. The nature of the formalin inactivation of poliomyelitis virus. *J immunol* 77: 444 – 452
- 95.**Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67 509–44
- 96.**Vialard, J. E., Yuen, L., and Richardson, C. D. 1990. Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which Identification and Characterization of a Baculovirus Occlusion Body Glycoprotein Which Resembles Spheroidin, an Entomopoxvirus Protein. *J Virol* 5804 – 5811
- 97.**Villa-Mancera, A.; Reynoso-Palomar, A.; Utrera-Quintana, F.; Carreón-Luna, C. 2014. Cathepsin L1 mimotopes with adjuvant Quil A induces a Th1/Th2 immune response and confers significant protection against *Fasciola hepatica* infection in goats. *Parasitol Res.*113: 243 – 250.
- 98.**Volkman, L. E.; Summers, M. D.; Hsieh, C. H. 1976. Occluded and Nonoccluded Nuclear Polyhedrosis Virus Grown in *Trichoplusia ni*: Comparative Neutralization, Comparative Infectivity, and In Vitro Growth Studies *J Virol* 19 (3) 820 – 832
- 99.**Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. 1988. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Anal Biochem* 175 231-237
- 100.** Xiang, X., Chen, L., Hu, X., Yu, S., Yang, R., and Wu, X. 2011. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus odv-e66 is an essential gene required for oral infectivity. *Virus Res* 158 (1 – 2) 72–8
- 101.** Xin-Gang, X. and Hung-Jen, L. 2008. Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine* 26 5455–5460

102. Yang, L. P. H. 2013. Recombinant Trivalent Influenza Vaccine (Flublok®): A Review of Its Use in the Prevention of Seasonal Influenza in Adults. *Drugs* 73 1357 – 1366
103. Yang, S. and Miller, L. K. 1998. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. *Virology* 248 131 – 138
104. Yip, H. C.; Karulin, A. Y.; Tary-Lehmann, M.; Hesse, M. D.; Radeke, H.; Heeger, P. S.; Trezza, R. P.; Heinzl, F. P.; Forsthuber, T.; Lehmann, P. V. 1999. Adjuvant-guided type 1 and type 2 immunity: infectious/non infectious dichotomy defines the class of response. *J Immunol* 162 3942 – 3949
105. Yoon, H. A.; Aleyas, A. G.; George, J. A.; Park, S. O.; Han, Y. W.; Kang, S. H.; Cho, J. G.; Eo, S. K. 2006. Differential segregation of protective immunity by encoded antigen in DNA vaccine against pseudorabies virus. *Immunol Cell Biol* 84 502 – 511
106. Yoshida, M. and Babensee, J. E. 2006. Differential effects of agarose and poly(lactic–coglycolic acid) on dendritic cell maturation. *J Biomed Mater Res A* 79 (2) 393 – 408
107. Yount, J. S.; Kraus, T. A.; Horvath, C. M.; Moran, T. M.; López, C. B. 2006. A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation. *J Immunol* 177 4503–4513
108. Yuan, M.; Huang, Z.; Wei, D.; Hu, Z.; Yang, K.; Pang, Y. 2011. Identification of *Autographa Californica* Nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids *J Virol* 85 (2) 11664 – 11674
109. Yusibov, V and Rabindrand, S. 2008. Recent progress in the development of plant derived vaccines. *Expert Rev* 7 (8) 1173-1183
110. Yusibov, V.; Streatfield, S. J.; Kushnir, N. 2011. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals Vaccines, antibodies and beyond. *Hum vacci* 7 (3) 313 – 321