

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE VIRUS DE LA
GRANULOSIS AISLADOS DE *Tecia solanivora*.**

MARÍA LORENA HERRERA CRUZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

LAURA FERNANDA VILLAMIZAR

Directora

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D. C., Marzo de 2006**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE VIRUS DE LA
GRANULOSIS AISLADOS DE *Tecia solanivora*.**

MARÍA LORENA HERRERA CRUZ

APROBADO

LAURA VILLAMIZAR. M. Sc.
Directora

ORLANDO TORRES. M. Sc.
Asesor

GUSTAVO ARBELAEZ
Jurado

CARLOS ESPINEL CORREAL
Jurado

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE VIRUS DE LA
GRANULOSIS AISLADOS DE *Tecia solanivora*.**

MARÍA LORENA HERRERA CRUZ

APROBADO

ANGELA UMAÑA MUÑOZ. M.Phil

Decana académica

DAVID GÓMEZ MÉNDEZ. M. Sc.

Director de Carrera

A Dios, que es mi energía,
mis padres y hermanos, mi razón de vivir
y para todos los que me quieren y se preocupan por mí.

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a Laura Villamizar, investigadora del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA-Tibaitatá y directora de este trabajo por los conocimientos transmitidos, el apoyo y la paciencia durante el desarrollo de este estudio.

A Orlando Torres, docente de la Pontificia Universidad Javeriana por la asesoría brindada.

A la Doctora Alba Marina Cotes, directora del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA-Tibaitatá, por el apoyo a la investigación y a la formación de un pensamiento crítico.

A todos los investigadores y auxiliares del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA-Tibaitatá que de una u otra manera hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos por el apoyo y los buenos consejos y a todos los que permitieron que este trabajo se llevara a término.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1 BACULOVIRUS.....	15
2.1.1 Generalidades	15
2.1.2 Clasificación	15
2.1.3 El virus de la granulosis.....	16
2.1.4 Morfología.....	16
2.2 ANTÍGENOS	18
2.3 SISTEMA INMUNITARIO.....	19
2.4 ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNITARIO	21
2.4.1 Fuentes de linfocitos	22
2.4.2 Órganos linfoides primarios.....	23
2.4.2.1 Timo.....	23
2.4.2.2 Piel.....	24
2.4.2.3 Bolsa de Fabricio	25
2.4.2.4 Placas de Peyer	25
2.4.2.5 Médula ósea	26
2.4.3 Órganos linfoides secundarios	26
2.4.3.1 Ganglios linfáticos	27
2.4.3.2 Ganglios hemolinfáticos	28
2.4.3.3 Bazo	28
2.4.3.4 Glándula de Harder	29
2.4.3.5 Otros órganos linfoides secundarios	29
2.5 ANTICUERPOS	30
2.5.1 Generalidades	30
2.5.2 Estructura de los anticuerpos (Inmunoglobulinas).....	31
2.5.3 Inmunoglobulina G (IgG).....	34
2.5.4 Inmunoglobulina Y (IgY).....	35
2.5.5 Tipos de anticuerpos	37
2.5.6 Comparación entre IgG de mamíferos e IgY aviar	38
2.6 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS.....	40
2.6.1 Precipitación con sulfato de amonio	41
2.6.2 Kit comercial de extracción de IgY EGGstract IgY Purification System® de PROMEGA42	
2.7 SEROLOGÍA	43
2.7.1 Caracterización de anticuerpos	43
2.7.1.1 Enzimoinmunoanálisis (ELISA).....	43
2.7.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)...	44
2.7.1.3 Inmunotransferencia (Western blot)	45
2.7.1.4 Ensayo en gota (Dot blot)	46
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	47
3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	47
3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	47

4. OBJETIVOS.....	50
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
5. METODOLOGÍA.....	51
5.1 Propagación del virus.....	51
5.2 Purificación del virus.....	51
5.3Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	52
5.4 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de gallinas.....	53
5.4.1Inoculación de las gallinas.....	53
5.4.2Purificación de los anticuerpos mediante deslipidación y precipitación de proteínas.....	54
5.5 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de conejos.....	54
5.5.1Inoculación de los conejos.....	54
5.5.2Purificación de los anticuerpos.....	55
5.6Determinación de la pureza del antígeno por SDS-PAGE.....	55
5.7Determinación de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno.....	57
5.8Reconocimiento de la proteína antigénica viral.....	58
5.8.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	58
5.8.2 Western blot.....	58
5.9Titulación de anticuerpos mediante prueba de ELISA.....	59
5.9.1 Criss-cross.....	59
5.9.2 ELISA de titulación.....	60
5.10 Identificación de los aislamientos nativos.....	61
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
6.1 Propagación y purificación del virus.....	63
6.2 Cuantificación de proteínas antigénicas por el método de Bradford.....	65
6.3 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de gallinas.....	67
6.4 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de conejos.....	70
6.5 Determinación de pureza del antígeno.....	72
6.6 Determinación de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno.....	74
6.7 Reconocimiento de la proteína antigénica viral.....	78
6.8 Titulación de anticuerpos mediante prueba de ELISA.....	82
6.9 Identificación de los aislamientos nativos.....	89
7. CONCLUSIONES.....	94
8. RECOMENDACIONES.....	95
9. REFERENCIAS.....	96
10. ANEXOS.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de los granulovirus.....	17
Figura 2. Contribución de diversos tejidos linfoides al desarrollo del sistema inmunitario.....	29
Figura 4. Diferencias estructurales entre IgG de mamífero e IgY aviar.	37
Figura 5. Gradiente de glicerol para la purificación de granulovirus.	65
Figura 6. Curva de calibración de Bradford.	67
Figura 7. Inoculación intramuscular en la pechuga de una gallina.	68
Figura 8. Inoculación intramuscular en la pierna de un conejo.....	71
Figura 9. Electroforesis de proteínas para la determinación de pureza del antígeno.	73
Figura 10. Dot blot de especificidad de las IgY por el antígeno.....	77
Figura 11. Dot blot de especificidad de las IgG por el antígeno.....	77
Figura 12. Membrana de nitrocelulosa de la prueba de Western blot para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina.....	79
Figura 13. Membrana de nitrocelulosa de la prueba de Western blot para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo.	79
Figura 14. Criss-cross para los anticuerpos producidos en gallina.....	82
Figura 15. Criss-cross para los anticuerpos producidos en conejo.....	83
Figura 16. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para las IgYs	85
Figura 17. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para las IgGs.....	85
Figura 18. Titulación para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo	87
Figura 19. Identificación de los aislamientos nativos por una prueba de ELISA con anticuerpos producidos en gallina.	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las características de IgG de mamíferos e IgY aviar.	40
Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos en la titulación de IgYs anti-granulivirus del Perú.....	88
Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos en la titulación de IgGs anti-granulivirus del Perú.....	89
Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos en la identificación de los aislamientos nativos mediante la prueba de ELISA.....	90

RESUMEN

La polilla guatemalteca, *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelichiidae), es una plaga de importancia económica en los cultivos de papa. El granulovirus de *Phthorimaea operculella* proveniente del Perú se ha utilizado para el control de *T. solanivora* en nuestro país con resultados promisorios bajo condiciones de almacenamiento de semilla. Sin embargo, esta cepa es foránea y aislada de otro hospedero, por tal razón, CORPOICA realizó la búsqueda de aislamientos virales nativos obtenidos de *T. solanivora*, a los cuales se les han realizado diferentes pruebas para su identificación con miras a comprobar si pertenecen al grupo de los granulovirus, sin embargo, algunas pruebas resultan costosas, demoradas o poco precisas, por lo que surge la necesidad de desarrollar otro método para determinar la identidad de los virus colectados.

En el presente trabajo, se produjeron anticuerpos policlonales tanto en gallina como en conejo contra el granulovirus del Perú, para el desarrollo de una prueba de ELISA. Se seleccionó el sistema gallina por ser más eficiente y menos dispendioso para la obtención y purificación de los anticuerpos. Se realizaron pruebas de Dot blot y Western blot para determinar la afinidad de los anticuerpos producidos por el antígeno, a partir de las cuales se comprobó que efectivamente los anticuerpos reconocían las partículas virales y se observó una mayor afinidad por una proteína de aproximadamente 30 KDa que correspondería a la granulina, mayoritaria en los granulovirus. Sin embargo, los anticuerpos producidos presentaron algunas reacciones inespecíficas. El título de anticuerpos y la concentración óptima de recubrimiento fueron 1/128 y 200 ng de virus por ml para gallina y 1/1024 y 13 µg de virus por ml para conejo, respectivamente. Finalmente, se confirmó la identidad de los aislamientos virales nativos como granulovirus, mediante la prueba de ELISA desarrollada.

ABSTRACT

Tecia solanivora (Lepidoptera: Gelechiidae) is an insect pest that significantly affects potato crops in Colombia and other countries. Peruvian *Phthorimaea operculella* granulovirus has been used for controlling *T. solanivora* in our country with promissory results under storage conditions of potato seeds. However, that strain is foreign and was isolated from other host, for this reason, CORPOICA carried out the *T. solanivora* native strains collection. These native strains have been identified by used different assays in order to establish their identity as granulovirus, but these techniques are time consuming, expensive or present low precision, being necessary to develop other method for confirming the native viruses identities. Policlonal antibodies against Peruvian granulovirus were produced in hens and rabbits in order to develop a ELISA test. Antibodies production by using hens was selected because it was more efficient and easier than antibodies production in rabbits. Dot blot and Western blot assays were carried out to determine the affinity of antibodies to the antigen. Obtained results demonstrated that antibodies recognized the virus particles and they had major affinity for a 30 KDa protein which corresponds to the granulina, the major protein in granulovirus. However, produced antibodies presented some inespecific reactions. The antibodies titer and optimum antigen cover concentration were 1/128 and 200 ng/ml for hen and 1/1024 and 13 µg/ml for rabbit, respectively. Finally, native strains identity were confirmed as granulovirus by using the developed ELISA test.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Baculoviridae comprende un gran número de virus que infectan artrópodos, en su mayor parte insectos del orden Lepidoptera. Esta familia consta de dos géneros: Nucleopolyhedrovirus (NPV) y Granulovirus (GV). Estos virus se caracterizan por tener un estrecho espectro de hospederos y una elevada patogenicidad, cualidades que los hace aptos para la utilización como bioinsecticidas.

Tal es el caso de un granulovirus aislado de larvas de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae), una de las mayores plagas de la soja en Argentina, el cual se ha venido utilizando en el proceso de obtención de un bioplaguicida para el control de estas larvas.

En el Perú se aisló un granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), el cual, es utilizado en la producción de un bioinsecticida para el control de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), plaga que afecta los cultivos de papa generando grandes pérdidas anuales en nuestro país.

En Colombia, se ha venido trabajando con este virus con el propósito de reemplazar los insecticidas químicos que se han usado durante años. Asimismo, CORPOICA ha trabajado en la búsqueda de cepas nativas aisladas de *T. solanivora* con el fin de obtener mejores resultados de eficiencia en el control de la plaga, sin embargo, la identificación del virus suscita algunos inconvenientes puesto que la mayoría de los métodos utilizados para la detección de los baculovirus son muy costosos o dispendiosos, como es el caso de la amplificación de genes por PCR o el análisis del DNA por RFLP.

Los métodos inmunológicos resultan ser una buena alternativa para la detección y cuantificación de los granulovirus, tanto de aislamientos nuevos como en pruebas de control de calidad de los productos formulados, siendo la prueba de ELISA uno de los ensayos más fáciles y relativamente rápidos de realizar. Ahora bien, los anticuerpos para la prueba de ELISA se pueden obtener a partir de varios métodos, entre éstos, la purificación de IgG a partir de suero de conejo o la purificación de IgY a partir de huevos de gallina. La IgY es la principal inmunoglobulina del suero sanguíneo de las aves y es análoga a la IgG presente en los mamíferos, estando implicadas en la respuesta inmune secundaria.

Este trabajo por lo tanto, pretende producir anticuerpos policlonales específicos contra el granulovirus de *Phthorimaea operculella*, a partir de suero de conejo y de huevos de gallina, que serán de gran utilidad en la identificación de nuevas cepas y en el control de calidad del bioplaguicida a base de Granulovirus.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BACULOVIRUS

2.1.1 Generalidades

La familia *Baculoviridae* está constituida por virus ocluidos, en forma de bastón, con genoma DNA circular de doble cadena superenrollado cuyo tamaño oscila entre 100 y 180 kb dependiendo de la cepa (Pearson *et al.*, 2000). Los viriones maduros, al final del ciclo de infección, son rodeados por una matriz de proteína conocida como cuerpo de inclusión (Parola *et al.*, 2003).

La familia *Baculoviridae* puede subdividirse en dos géneros: los virus de la polihedrosis nuclear (VPN) y los virus de la granulosis o granulovirus (VG); ambos géneros se diferencian por la morfología (tamaño, forma y estructura) de sus cuerpos de inclusión y también en aspectos histopatológicos que son de interés taxonómico. Los VPNs forman cuerpos de inclusión grandes (1-15 μm) en forma de poliedro que contienen múltiples partículas virales, mientras que los VGs forman cuerpos de inclusión pequeños (400-600 nm) y ovoides llamados gránulos que generalmente contienen un solo virión (Caballero *et al.*, 2001; Luque *et al.*, 2001; Parola *et al.*, 2003). La principal proteína de los cuerpos de inclusión (granulina o poliedrina) ocupa alrededor del 95 % del total de proteína contenida en los cuerpos de inclusión (Parola *et al.*, 2003).

2.1.2 Clasificación

La clasificación actual de la familia *Baculoviridae* incluye a todos aquellos virus cuyos viriones presentan una estructura en forma de varilla o bastón y

que además, en un momento determinado del ciclo biológico, pueden ser incluidos en matrices de naturaleza proteica o cuerpos de inclusión. La familia está dividida en los géneros *Nucleopolyhedrovirus* y *Granulovirus* (Caballero *et al.*, 2001).

2.1.3 El virus de la granulosis

Los Granulovirus han sido aislados de más de 100 especies, todas ellas pertenecientes al orden Lepidoptera (Caballero *et al.*, 2001). Una de las especies más estudiadas ha sido el virus de la granulosis que se ha encontrado en varios países infectando naturalmente larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), denominada baculovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopVG) (Ben-Salah y Aalbu, 1992; CIP, 1992). Se ha encontrado que el granulovirus de *Phthorimaea operculella* es un agente de control biológico muy efectivo contra esta plaga y se presume que no infecta otros organismos que no sean artrópodos como aves, ganado o humanos (Zeddani *et al.*, 1999).

2.1.4 Morfología

Nucleocápside: consiste en una cápside proteica que contiene el ADN y otras proteínas; su función es la de transportar la información genética del virus en forma altamente compactada hasta la célula hospedera. La nucleocápside tiene un tamaño que oscila entre 30-66 nm y 250-300 nm. (Caballero *et al.*, 2001).

Virión: es el principal elemento infeccioso de los baculovirus tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como entre los órganos y tejidos de un mismo hospedero. El virión maduro se forma cuando la nucleocápside adquiere, en un momento determinado de la replicación del

virus, una envoltura o membrana que tiene una estructura trilaminar típica (Caballero *et al.*, 2001). Según Carter (1984), el virión contiene más de 35 proteínas.

Cuerpos de inclusión: los baculovirus, y en este caso los virus de la granulosis, sintetizan al final del proceso de infección grandes cantidades de poliedrina o granulina según el género, las cuales son proteínas que cristalizan formando una matriz o cuerpo de inclusión (OB) con forma de poliedro irregular (poliedrina) o de gránulo (granulina) (Caballero *et al.*, 2001). En los cuerpos de inclusión, durante su morfogénesis, queda incluido generalmente un virión, lo cual les permite conservar su capacidad infecciosa fuera del hospedero; en casos raros, los gránulos contienen más de un virión (Sciocco-Cap *et al.*, 2001).

Los OBs son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación o liofilización, todas las cuales son características que les confieren persistencia en el medio. En cambio, son solubles en soluciones alcalinas como las que se dan en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11), lo cual facilita la liberación de los viriones para que puedan iniciar una infección (Caballero *et al.*, 2001).

En la figura 1 se puede observar la estructura de un granulovirus con las partes anteriormente descritas.

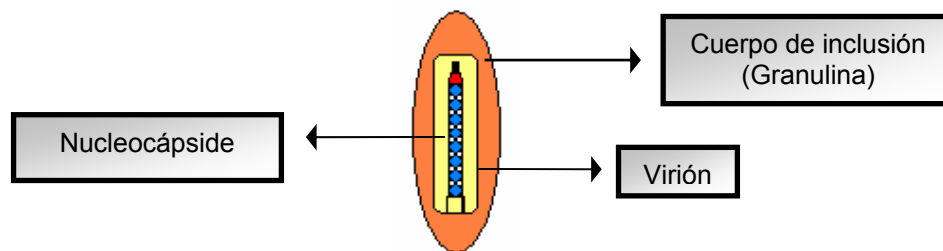


Figura 1. Características morfológicas de los granulovirus (Gómez, 2005).

Genoma: El genoma de los granulovirus está organizado en una única molécula circular de DNA de doble cadena que contiene 100 y 200 genes; su tamaño puede oscilar entre 80 y 180 kilopares de bases (Caballero *et al.*, 2001). Aunque el DNA de los baculovirus se replica en el núcleo, los baculovirus llevan su propio complemento de genes que codifican las proteínas encargadas de la replicación del DNA. En el caso de los granulovirus, la replicación comienza en el núcleo de las células infectadas pero en general se produce inmediatamente la ruptura de la membrana nuclear y por consiguiente, el ciclo y la morfogénesis viral continúa en la mezcla resultante de componentes citoplasmáticos y nucleares (Caballero *et al.*, 2001; Herniou *et al.*, 2003).

2.2 ANTÍGENOS

Un antígeno es cualquier sustancia que puede unirse específicamente a una molécula de anticuerpo o a un receptor de linfocito T. Los anticuerpos pueden reconocer como antígenos a casi todos los tipos de moléculas biológicas, tales como metabolitos intermediarios simples, azúcares, lípidos, hormonas, así como a macromoléculas tales como hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Asimismo, las moléculas que estimulan respuestas inmunológicas se denominan inmunógenos y son generalmente componentes macromoleculares de los patógenos, como es el caso de sus proteínas de superficie (Abbas y Lichtman, 2004; Madigan *et al.*, 2004).

Las macromoléculas suelen ser mucho más grandes que los puntos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo. Por tanto, cualquier anticuerpo se fija sólo a una porción de la macromolécula, que se denomina determinante o epítipo. Las macromoléculas contienen por lo general múltiples

determinantes, algunos de los cuales pueden estar repetidos y cada uno, por definición, puede ser unido por un anticuerpo (Abbas y Lichtman, 2004).

2.3 SISTEMA INMUNITARIO

Las células y las moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunitario y la respuesta colectiva y coordinada frente a sustancias extrañas se denomina respuesta inmunitaria. Inmunidad es una reacción frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción (Abbas y Lichtman, 2004).

Puesto que la supervivencia depende de la exclusión exitosa de los microorganismos invasores de un organismo vivo, no es de extrañar que se recurra a una gran variedad de estrategias de defensa. De hecho, los animales cuentan con múltiples líneas defensivas. Unas de las principales son las barreras físicas contra la invasión. Entre ellas se encuentran: la piel, los procesos de autolimpieza, como la tos, el estornudo y el flujo de moco en las vías respiratorias, el vómito y la diarrea en el tubo digestivo y el flujo de orina en las vías urinarias (Tizard, 2002).

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata (también denominada inmunidad natural) comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta. Sus principales componentes consisten en: barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias antimicrobianas), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (natural killer), proteínas de la sangre (complemento y otros mediadores de la

inflamación), y proteínas que reciben el nombre de citoquinas. Así, el organismo nace con la capacidad de reconocer a ciertos microorganismos y destruirlos. Un aspecto clave de la inmunidad innata es la capacidad del cuerpo de enfocar estos mecanismos innatos de defensa en los sitios de invasión bacteriana. Esta respuesta de defensa enfocada o concentrada se conoce como inflamación (Abbas y Lichtman, 2004; Tizard, 2002; Janeway, 1993).

La inmunidad adaptativa produce una respuesta a la infección y se adapta a ésta. Las características que definen la inmunidad adaptativa son una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo microorganismo. La inmunidad adaptativa es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de estímulos microbianos y no microbianos. Tiene una gran capacidad para distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso muy relacionados y por esta razón, también se denomina inmunidad específica. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos (Abbas y Lichtman, 2004). A medida que se adquiere inmunidad específica contra un invasor, la posibilidad de que ese mismo patógeno vuelva a invadir con éxito se reduce considerablemente (Tizard, 2002).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar distintos tipos de microorganismos. La inmunidad humoral está mediada por moléculas de la sangre y las secreciones mucosas, los anticuerpos que son producidos por los linfocitos B (células B). Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad infecciosa de los microorganismos y los eliminan mediante diversos mecanismos efectores. La

inmunidad mediada por células, denominada también inmunidad celular, está mediada por los linfocitos T. Ésta favorece la destrucción de los microorganismos que residen en los fagocitos o de las células infectadas con el fin de eliminar los reservorios de la infección (Abbas y Lichtman, 2004).

2.4 ÓRGANOS DEL SISTEMA INMUNITARIO

Si bien los antígenos son capturados y procesados por macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, el desarrollo de la respuesta inmunitaria es una función de las células llamadas linfocitos. Las cuales, son pequeñas células redondeadas que constituyen el tipo celular predominante en órganos como el bazo, ganglios linfáticos y timo. Los linfocitos tienen receptores para antígenos y por tanto, pueden reconocer al que se les presente y reaccionar a él. Por último, los linfocitos se encargan de la producción de anticuerpos y de la destrucción de células anormales. Estas respuestas ocurren en el interior de los órganos linfoides, los cuales suministran un entorno para la interacción eficiente entre linfocitos, células presentadoras de antígeno, y antígeno extraño (Tizard, 2002).

Las inmunorreacciones deben ser reguladas. Los linfocitos deben ser seleccionados, de manera que los que se produzcan sólo sean reactivos frente a los antígenos extraños y no frente a los antígenos propios (autoantígenos). Asimismo, la magnitud de la respuesta de cada linfocito debe regularse, de manera que sea suficiente para las necesidades del organismo, sin excederlas. Por esa razón, los órganos del sistema linfoide pueden clasificarse con base en las funciones que desempeñan en la generación de linfocitos, en la regulación de su producción y en el suministro de un ambiente apropiado para la interacción entre los antígenos procesados y las células sensibles a antígeno (Tizard, 2002).

2.4.1 Fuentes de linfocitos

En las etapas tempranas de la vida fetal, las células madre linfoides comienzan a producirse en el epiplón primitivo, el hígado fetal y el saco vitelino. En los fetos de etapas más avanzadas y en los animales adultos, la médula ósea es la fuente más importante de linfocitos (Tizard, 2002).

La médula ósea tiene múltiples funciones en los mamíferos adultos. Es un órgano hematopoyético que produce todas las células sanguíneas, incluyendo linfocitos y células dendríticas. En algunos animales, como los primates, también actúa como órgano linfóide primario en el cual maduran algunas poblaciones de linfocitos. Al igual que el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, la médula ósea contiene múltiples macrófagos, y por tanto retira antígenos particulados de la sangre. Por último, es una fuente importante de anticuerpos. Debido a estas múltiples funciones, la médula ósea se divide en dos compartimientos, uno hematopoyético y otro vascular. Los dos se alternan en zonas con forma de cuña dentro de los huesos largos. El compartimiento hematopoyético contiene precursores de todas las células sanguíneas, así como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, y está encerrado por una capa de células de la adventicia. El compartimiento vascular consiste en sinusoides sanguíneos revestidos por células endoteliales y atravesados por células reticulares y macrófagos (Tizard, 2002).

Los tejidos linfáticos se clasifican en órganos generadores, también denominados linfáticos primarios, donde los linfocitos expresan por primera vez los receptores antigénicos y alcanzan la madurez fenotípica y funcional, y en órganos periféricos, también denominados linfáticos secundarios, donde se inician y desarrollan las respuestas linfocíticas ante los antígenos extraños (Abbas y Lichtman, 2004).

2.4.2 Órganos linfoides primarios

Se llaman así a aquellos órganos que regulan la producción y diferenciación de linfocitos. Los linfocitos maduros corresponden a dos poblaciones principales que se denominan linfocitos T y linfocitos B, dependiendo de cuáles sean los órganos linfoides primarios en los que maduran. De tal modo, los linfocitos T se diferencian en el timo, un órgano que se encuentra tanto en mamíferos como en aves. En contraste, los linfocitos B se diferencian en varios órganos distintos: la bolsa de fabricio en aves, la médula ósea en primates y roedores, y determinadas placas de Peyer en rumiantes y cerdos. Todos estos órganos se generan en una etapa temprana de la vida fetal. A medida que el animal se desarrolla, las células madre linfoides procedentes del epiplón, hígado fetal y por último de la médula ósea emigran hacia el interior de los órganos linfoides primarios (Tizard, 2002).

2.4.2.1 Timo

El timo se localiza en el espacio mediastínico anterior. Su volumen varía considerablemente, su tamaño relativo es mayor en un animal recién nacido, en tanto que el absoluto es mayor en el momento de la pubertad. Después de ésta se atrofia y su corteza es reemplazada por tejido adiposo, pero persisten remanentes hasta edad avanzada (Tizard, 2002).

El timo está formado por lóbulos de células epiteliales, agrupadas en forma laxa y cada uno de dichos lóbulos se encuentra cubierto por una cápsula de tejido conectivo. La parte externa de cada lóbulo, llamada corteza, aparece densamente infiltrada de linfocitos, pero la médula interna contiene menos de éstos y las células epiteliales se observan con claridad (Tizard, 2002).

A medida que el animal envejece ocurre la pérdida progresiva de tejido tímico, el cual es sustituido por grasa. Sin embargo, el timo envejecido sigue conteniendo islas de tejido linfoide, incluidas corteza y médula, y es funcionalmente activo (Tizard, 2002).

El timo neonatal es la fuente de la mayor parte de los linfocitos circulantes en la sangre y estos linfocitos son responsables principalmente de montar inmunorreacciones mediadas por células. Se les llama linfocitos derivados del timo, o simplemente linfocitos T. En realidad, las células precursoras de los linfocitos T se originan en la médula ósea, pero de inmediato son llevadas al interior del timo. Una vez dentro de este órgano, dichas células (denominadas timocitos) se dividen con rapidez. De las nuevas células producidas, la mayor parte mueren pronto, pero las que sobreviven permanecen cuatro o cinco días antes de emigrar y colonizar los órganos linfoides secundarios (Tizard, 2002).

2.4.2.2 Piel

La piel contiene un sistema inmunitario especializado formado por linfocitos y células presentadoras de antígeno. La piel es el órgano más grande del cuerpo y supone una barrera física importante entre el organismo y su medio externo. Además, la piel participa de forma activa en la defensa del hospedero y tiene capacidad para generar y mantener reacciones inflamatorias e inmunitarias locales (Abbas y Lichtman, 2004). La piel tiene el mismo origen embrionario que el timo, y también podría ser un sitio de maduración de linfocitos T. En la piel, estos interactúan con los queratinocitos, y tal vez maduren en el interior de la epidermis. Sin embargo, la piel es rica en células dendríticas, que constituyen una eficaz barrera para atrapar antígenos, de modo que los linfocitos T cutáneos podrían también cumplir una función de defensa local (Tizard, 2002).

2.4.2.3 Bolsa de Fabricio

Se trata de un órgano que se encuentra sólo en aves. Es una estructura redondeada en forma de saco, exactamente en posición dorsal respecto a la cloaca. Al igual que el timo, la bolsa alcanza su mayor tamaño en el pollo, una a dos semanas después de la eclosión, tras lo cual involucrea gradualmente (Tizard, 2002).

La bolsa está formada por linfocitos embebidos en el tejido epitelial. Este último reviste un saco hueco conectado a la cloaca por un conducto. La bolsa de Fabricio constituye un sitio de maduración y diferenciación para las células del sistema productor de anticuerpos. A ellos se debe el nombre de linfocitos B. Esta bolsa funciona como el timo, en el sentido de que sus linfocitos B proliferan con rapidez, pues más de 5 % de los linfocitos de la bolsa se dividen cada media hora. Sin embargo, del 90 al 95 % de estos linfocitos B mueren pronto por apoptosis (Tizard, 2002; Halliwell y Gorman, 1992).

Se ha revelado que la bolsa de Fabricio no es un órgano linfoide primario puro, puesto que atrapa antígenos y realiza alguna síntesis de anticuerpos, es capaz de promover interacciones entre células y antígenos. También contiene un pequeño foco de linfocitos T, inmediatamente arriba de la abertura del conducto (Tizard, 2002; Halliwell y Gorman, 1992).

2.4.2.4 Placas de Peyer

Las placas de Peyer (PP) son grandes masas linfoides presentes en las paredes intestinales. Su estructura y función varían de una especie a otra, pero se observan dos agrupamientos distintos. Así, en rumiantes, cerdos, caballos, perros y ser humano (grupo 1) las PP se encuentran de manera

predominante en el íleon. Estas PP ileales forman un solo agregado continuo de folículos linfoides. Las PP yeyunales constituyen múltiples acumulaciones bien delimitadas de folículos. En otros mamíferos (grupo 2), como conejos y roedores, las PP se encuentran a intervalos aleatorios entre íleon y yeyuno, y se desarrollan de modo distinto de como ocurre en el grupo 1. En éste, tal desarrollo ocurre antes del nacimiento. Las PP ileales alcanzan su tamaño máximo en una fase temprana de la vida y después involucionan de modo parecido a como ocurre con el timo. En contraste, las PP yeyunales persisten durante toda la vida del animal. En los mamíferos del grupo 2, las PP no se desarrollan sino hasta después del nacimiento y persisten hasta una edad avanzada (Tizard, 2002).

El comportamiento de las células en las placas de Peyer ileales se asemeja al de las propias de la bolsa de Fabricio. Por tanto, son sitios de proliferación rápida de linfocitos B, pero la mayor parte de éstos mueren por apoptosis y sólo se liberan unos cuantos a la circulación (Tizard, 2002).

2.4.2.5 Médula ósea

Es el lugar de origen de todas las células sanguíneas circulantes del adulto, incluidos los linfocitos inmaduros, y es el lugar donde maduran los linfocitos B (Abbas y Lichtman, 2004). No hay un sitio exclusivo de desarrollo de linfocitos B en la médula ósea, aunque se sugiere que sus precursores (prelinfocitos) se desarrollan en el borde externo de la médula y emigran hacia el centro conforme maduran y se multiplican. Al parecer ocurre una selección negativa en la médula ósea, de manera que la mayor parte de los prelinfocitos B generados son destruidos (Tizard, 2002).

2.4.3 Órganos linfoides secundarios

A diferencia de los órganos linfoides primarios, los secundarios se originan en una etapa tardía de la vida fetal y persisten durante toda la vida adulta. Reaccionan a la estimulación antigénica, y se desarrollan poco en los animales libres de gérmenes. La extirpación de un órgano linfóide secundario no reduce en grado significativo la capacidad inmunitaria. Entre los ejemplos de órganos linfoides secundarios están el bazo, los ganglios linfáticos y las acumulaciones linfáticas de las vías digestivas, respiratorias y urogenitales. Dichos órganos son ricos en macrófagos y en células dendríticas, las cuales capturan y procesan antígenos, así como en linfocitos T y B, que son los mediadores de las inmunorreacciones. La estructura anatómica global de estos órganos tiene un diseño que facilita la captación de antígenos, y que proporciona las máximas oportunidades para que los antígenos procesados sean presentados a las células sensibles a ellos (Tizard, 2002).

2.4.3.1 Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos son los órganos en que se inician las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos transportados por la linfa (Abbas y Lichtman, 2004). Pueden presentar forma redondeada o arriñonada (de fríjol). Se encuentran ubicados estratégicamente en los conductos linfáticos, de modo que puedan capturar los antígenos que la linfa transporta. En los ganglios linfáticos que han sido estimulados por antígeno, algunas de las células contenidas en estos nódulos se dilatan para formar focos de células en división llamados centros germinales, los cuales tienen zonas claras y zonas oscuras. Las oscuras son sitios donde los linfocitos B proliferan y sufren un proceso llamado mutación somática, durante el cual cambia al azar la capacidad del receptor antigénico de la célula de unirse a antígenos. Las células que aumentan su capacidad para responder a un antígeno salen del centro germinal para colonizar otros órganos linfoides secundarios (Tizard, 2002).

En las zonas claras, aquellos linfocitos B cuya capacidad de respuesta a antígenos está disminuida sufren apoptosis y son eliminados por macrófagos. Estas zonas pueden ser también sitios de conmutación de clase de inmunoglobulina y de formación de linfocitos B de memoria. Unos cuantos linfocitos T se encuentran en la corteza, en una región periférica inmediata a cada centro germinativo (Tizard, 2002).

2.4.3.2 Ganglios hemolinfáticos

Los ganglios hemolinfáticos son estructuras similares a los ganglios linfáticos y se encuentran asociados a vasos sanguíneos en rumiantes y otros mamíferos. No se conoce con claridad su función exacta. Sin embargo, la distribución de los linfocitos en ellos es esencialmente similar a la que se observa en los ganglios linfáticos ordinarios. Así, tienen una corteza que contiene centros germinales y linfocitos B (Tizard, 2002).

2.4.3.3 Bazo

El bazo es el lugar principal donde tienen lugar las respuestas inmunitarias a los antígenos que transporta la sangre (Abbas y Lichtman, 2004). Así como los ganglios linfáticos filtran antígenos de la linfa, el bazo filtra la sangre. En tal proceso se extraen tanto partículas antigénicas como células envejecidas. Además, el bazo almacena eritrocitos y plaquetas y durante la vida fetal, participa en la eritropoyesis. De este modo, se divide en dos compartimientos, uno para almacenamiento de eritrocitos, captación de antígenos y eritropoyesis, el cual recibe el nombre de pulpa roja y otro en el que ocurren las inmunorreacciones, la pulpa blanca (Tizard, 2002; Halliwell y Gorman, 1992).

Los antígenos que ingresan por vía intravenosa quedan atrapados en parte en el bazo, ahí son captados por los macrófagos. Dichos macrófagos transportan los antígenos a los folículos primarios de la pulpa blanca, y es a partir de éstos de donde, después de unos pocos días, emigran las células productoras de anticuerpo (Tizard, 2002).

2.4.3.4 Glándula de Harder

La glándula de Harder se encuentra en aves. Está localizada detrás del tercer párpado, tiene como principal tipo celular los plasmocitos y es responsable de la función inmunológica de la traquea, orbita de los ojos, cavidad nasal y tracto respiratorio superior (Noden, 1990).

2.4.3.5 Otros órganos linfoides secundarios

Entre los sitios de producción de anticuerpos se incluyen no sólo el bazo y los ganglios linfáticos, sino también la médula ósea, las amígdalas faríngeas y los tejidos linfoides que se encuentran dispersos en el organismo, en particular en las vías digestivas, respiratorias y urogenitales. Si bien su naturaleza dispersa hace difícil medirla, la médula ósea constituye la mayor masa de tejido linfoide secundario presente en el organismo (Tizard, 2002).

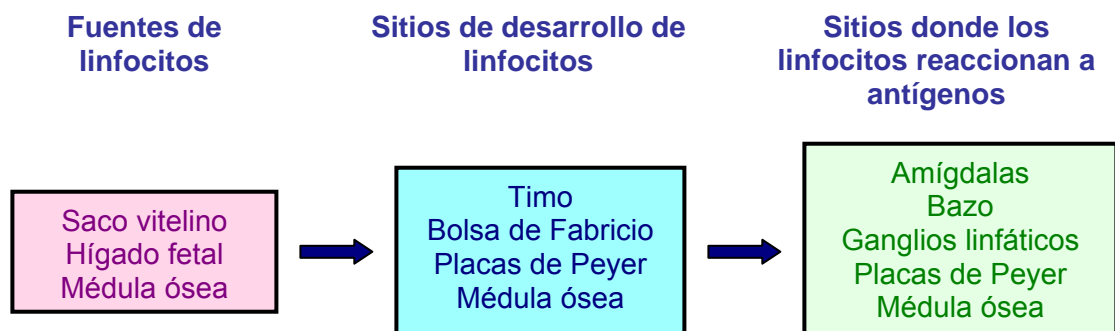


Figura 2. Contribución de diversos tejidos linfoides al desarrollo del sistema inmunitario (Tizard, 2002).

2.5 ANTICUERPOS

2.5.1 Generalidades

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) son moléculas de proteína solubles, producida por los linfocitos B que son las únicas células que sintetizan moléculas de anticuerpos y son capaces de combinarse con determinantes antigénicos. Se hallan presentes como receptores de superficie de los linfocitos B y dentro de ellos, se encuentran en compartimientos citoplasmáticos rodeados de membrana (retículo endoplasmático y complejo de Golgi), o se encuentran en forma soluble en el suero sanguíneo y en otros líquidos corporales como las secreciones gástricas y la leche, donde se encarga de neutralizar y opsonizar antígenos extraños. El suero que contiene anticuerpos específicos de antígeno se denomina habitualmente antisuero. Las inmunoglobulinas (Igs) pueden dividirse en cinco clases principales basándose en sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (Madigan *et al.*, 2004; Abbas y Lichtman, 2004).

Se observan linfocitos B en la corteza de los ganglios linfáticos, en la zona marginal del bazo, en la médula ósea y en las placas de Peyer del intestino. Sólo unos cuantos circulan en la sangre. Cada linfocito B porta una gran cantidad de receptores de antígeno idénticos; por tal razón, una célula sólo podrá unirse y reaccionar a un solo antígeno. Si un linfocito B encuentra un antígeno que pueda unirse a sus receptores, entonces, con estimulación adecuada, reaccionará generando anticuerpos. Cada linfocito productor de anticuerpo genera anticuerpos de una sola especificidad (Tizard, 2002).

Los receptores de linfocito B (BCR) se dividen en dos componentes: uno de ellos se une al antígeno y el otro envía señales apropiadas al linfocito B. Los

anticuerpos son simplemente formas solubles de BCR secretadas por los linfocitos B en los líquidos del organismo (Tizard, 2002).

2.5.2 Estructura de los anticuerpos (Inmunoglobulinas)

Todas las moléculas de anticuerpo comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad importante en las regiones que se unen a los antígenos. Esta variabilidad de las regiones que se unen a los antígenos explica la capacidad de los diferentes anticuerpos para unirse a un elevado número de antígenos estructuralmente diferentes. Las regiones variables se denominan así porque contienen zonas de variabilidad en la secuencia de aminoácidos que distinguen a los anticuerpos elaborados por un clon de linfocitos B de los fabricados por otros clones (Abbas y Lichtman, 2004).

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas de 160 kDa que constan de cuatro cadenas peptídicas. Dos de estas cadenas pesan alrededor de 60 kDa y se les denomina cadenas pesadas. Las otras dos son mucho menores (con un peso molecular de unos 25 kDa), y por ello se les denomina cadenas ligeras. Ambas cadenas ligeras son idénticas entre sí, al igual que ambas cadenas pesadas (Fig. 3) (Tizard, 2002; Janeway, 1993).

Cadenas ligeras: constan de dos dominios. Las secuencias de aminoácidos en el dominio C terminal de cada cadena ligera son idénticas. En cambio, las secuencias en el dominio N terminal son diferentes en cada cadena ligera que se examine. Por tal razón, estos dos dominios en una cadena ligera se conocen con los nombres de dominio constante (C_L) y dominio variable (V_L), respectivamente (Tizard, 2002). Las regiones variables aminotermiales (V) participan en el reconocimiento antigénico (Abbas y Lichtman, 2004).

Cadenas pesadas: cada cadena pesada consta de cuatro o cinco dominios. La secuencia de aminoácidos del extremo N terminal es altamente variable, por ello se denomina dominio variable (V_H). Los dominios restantes muestran pocas diferencias en su secuencia y por tanto forman una región constante (C_H) (Tizard, 2002). Las regiones constantes carboxiterminales (C) de las cadenas pasadas son las que median las funciones efectoras. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante puentes disulfuro (Abbas y Lichtman, 2004).

Los dominios C terminales de las cadenas pesadas se insertan en la bicapa lipídica de la membrana superficial del linfocito B. Las cadenas ligeras están unidas por enlaces disulfuro (puentes disulfuro) a la mitad N terminal de las cadenas pesadas, de tal suerte que la molécula adquiere la forma de una Y. La cola de la Y (llamada región Fc) se une a la membrana del linfocito B. Los brazos de la Y (regiones Fab) se unen al antígeno (Fig. 3) (Tizard, 2002).

Cuando las moléculas de IgG se incuban con la enzima papaína, en presencia de compuestos sulfidrílo a baja concentración, los enlaces peptídicos en la región bisagra se separan liberando los fragmentos. Estos se denominaron fragmento Fab (del inglés, fragment of antigen binding) y fragmento Fc (del inglés, fragment crystallizable) (Outteridge, 1989; Madigan *et al.*, 2004). Los sitios de unión al antígeno están formados por el surco o ranura que queda entre una cadena ligera y una pesada. De esta manera, el BCR tiene dos sitios de unión al antígeno que se hallan en las porciones aminoterminales de la cadena pesada y ligera (Tizard, 2002).

El punto de divergencia de los dos brazos de la molécula en forma de Y se conoce como región bisagra. Es significativa puesto que la combinación del anticuerpo con el antígeno parece exponer sitios previamente ocultos en la región bisagra para una interacción con los receptores superficiales de los

linfocitos (Outteridge, 1989). La región de la bisagra contiene un gran número de residuos hidrófilos y prolina. Los residuos hidrófilos hacen que la cadena peptídica se extienda y, de este modo, favorecen el acceso de enzimas proteolíticas a la región. La prolina, debido a su configuración, produce un “doblez” de 90° cuando se inserta en una cadena peptídica (Tizard, 2002).

Las moléculas de anticuerpos se pueden dividir en distintas clases y subclases atendiendo a las diferencias en la estructura de sus regiones constantes carboxiterminales de la cadena pesada (Abbas y Lichtman, 2004). Las inmunoglobulinas pueden diferenciarse no sólo por sus secuencias, sino también por las estructuras antigénicas a que dan origen. Igualmente, las clases de anticuerpos difieren entre sí en muchos aspectos: su vida media, su distribución en el organismo, su capacidad para fijar el complemento y su capacidad para fijarse a los receptores Fc de la superficie celular (Roitt, 2003).

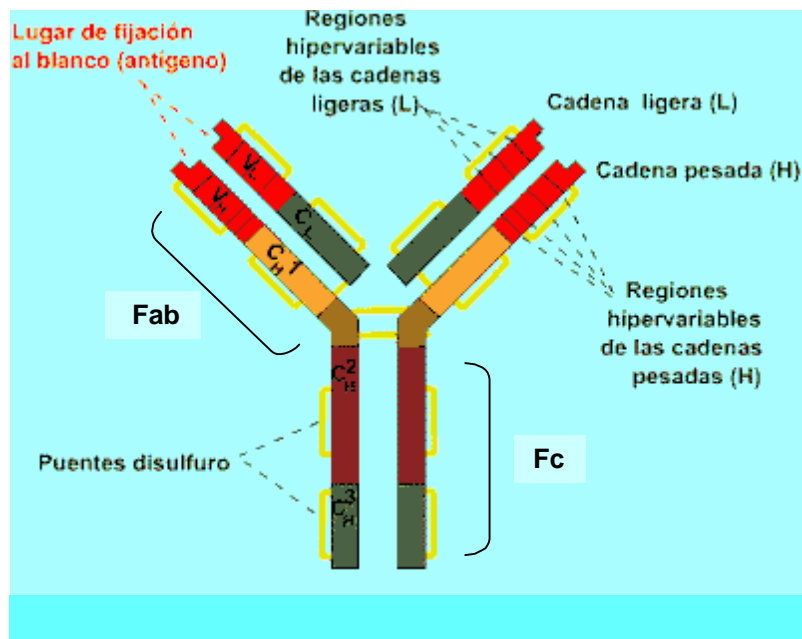


Figura 3. Estructura básica de un anticuerpo IgG.

Existen cinco tipos de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, llamados alfa, gamma, delta, épsilon y mu (α , γ , δ , ϵ y μ), que definen la clase o isotipo de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas con dos cadenas pesadas alfa se denominan inmunoglobulina A (IgA), las que contienen dos cadenas gamma se llaman IgG, dos cadenas μ forman IgM, dos delta constituyen IgD, y un par de cadenas épsilon generan IgE (Tizard, 2002).

2.5.3 Inmunoglobulina G (IgG)

La IgG es producida y secretada por células plasmáticas del bazo, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Tiene la estructura típica de un BCR, está formada por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas gamma. Las cadenas ligeras son de tipo kappa o lambda (Fig. 3). Es la inmunoglobulina más pequeña y se adhiere con facilidad a los antígenos extraños. Los anticuerpos de IgG activarán el sistema del complemento sólo si en la superficie del antígeno se han acumulado moléculas suficientes en una configuración correcta (Tizard, 2002).

Debido a su relativa abundancia en la circulación y en la mayoría de los tejidos, la capacidad para desarrollar una fijación con el antígeno de elevada afinidad, y el amplio espectro de sus propiedades biológicas secundarias, La IgG es el principal caballo de batalla de las Ig. Dado que la IgG difunde con mayor facilidad que las demás inmunoglobulinas hacia los espacios extravasculares corporales, es la especie predominante en los tejidos no mucosos, donde carga con la mayor responsabilidad en la neutralización de las toxinas bacterianas y en la fijación de microorganismos para facilitar la fagocitosis. La IgG es la única clase de Ig capaz de atravesar la placenta en el ser humano, por lo que proporciona una primera línea de defensa vital (Roitt, 2003).

La IgG se encuentra en una concentración sérica de 13,5 mg/ml, tiene una semivida en suero de 23 días y entre sus principales funciones se encuentran la opsonización, la activación del complemento, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la inmunidad neonatal y la inhibición por retroalimentación de linfocitos B (Abbas y Lichtman, 2004).

2.5.4 Inmunoglobulina Y (IgY)

La inmunoglobulina de bajo peso molecular de peces pulmonados, anfibios, reptiles y aves se denomina inmunoglobulina Y (IgY). Al igual que las inmunoglobulinas de los mamíferos (IgG), consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras. Las cadenas pesadas se denominan ípsilon (υ) y casi siempre se componen de un dominio variable y cuatro constantes; la molécula completa tiene peso molecular aproximado de 180 kDa. Sin embargo, también se encuentra una isoforma trunca que sólo tiene dos dominios constantes. Esta isoforma tiene peso molecular cercano a 120 kDa (Fig. 3). Los pollos sólo tienen moléculas completas (Tizard, 2002; Alarcón *et al.*, 2000; Warr *et al.*, 1995).

La isoforma incompleta de IgY se produce por el empalme alternado del mRNA de la cadena pesada. Por tanto, su nombre correcto sería IgY (Δ Fc). Ya que la molécula carece de región Fc, no tiene las funciones efectoras usuales de la inmunoglobulina, como activación del complemento o unión a FcR. Ambas isoformas de IgY carecen de región de bisagra, lo cual hace pensar que estas moléculas son bastante inflexibles. Tienden a presentar diversidad un tanto restringida y maduración de afinidad limitada. Sin embargo, en las IgY hay regiones cerca de los límites de los dominios Cu1-Cu2 y Cu2-Cu3 que contienen residuos de prolina y glicina. Estas regiones tienen el potencial de conferir una limitada flexibilidad a la molécula (Alarcón *et al.*, 2000; Tizard, 2002; Warr *et al.*, 1995).

Comparaciones de las secuencias de las regiones constantes en IgG e IgY muestran que los dominios Cy2 y Cy3 de IgG están más estrechamente relacionados con los dominios Cu3 y Cu4 de IgY, respectivamente, y que el equivalente al dominio Cu2 está ausente en las cadenas γ . Este dominio fue probablemente condensado para formar la región de la bisagra en IgG. La bisagra es una característica singular de la Ig de los mamíferos. Los estudios sobre las interrelaciones de las inmunoglobulinas de los vertebrados muestran con claridad que la IgY se relaciona con la IgG y la IgE de los mamíferos (Tizard, 2002; Warr *et al.*, 1995).

Los pollos generan diversidad de anticuerpos de una manera muy distinta a la observada en mamíferos. La línea germinal contribuye poco a la diversidad, debido a que sólo hay un segmento génico V y uno J para las cadenas ligeras y pesadas. La diversidad proviene de mutación somática que implica conversión génica. Por otro lado, la transposición de los genes de inmunoglobulinas aviares no es un proceso continuo como en los mamíferos (Tizard, 2002).

El anticuerpo IgY, al igual que la unión entre IgG y FcRn (receptor neonatal de Fc), tiende a unirse a su receptor bajo condiciones levemente ácidas y a liberarse del receptor bajo condiciones levemente básicas. Hablando un poco de las funciones de la IgY en la maternidad, en la inmunidad pasiva adquirida, la mayoría de las especies que poseen IgY son ovíparas. En animales que producen sólo IgY, o IgY junto a IgY (Δ Fc), la inmunoglobulina es transportada al embrión a través de la yema. Por otra parte, es difícil generalizar acerca de las funciones de la IgY, ya que ésta se da en diferentes especies como se mencionó anteriormente (Warr *et al.*, 1995).

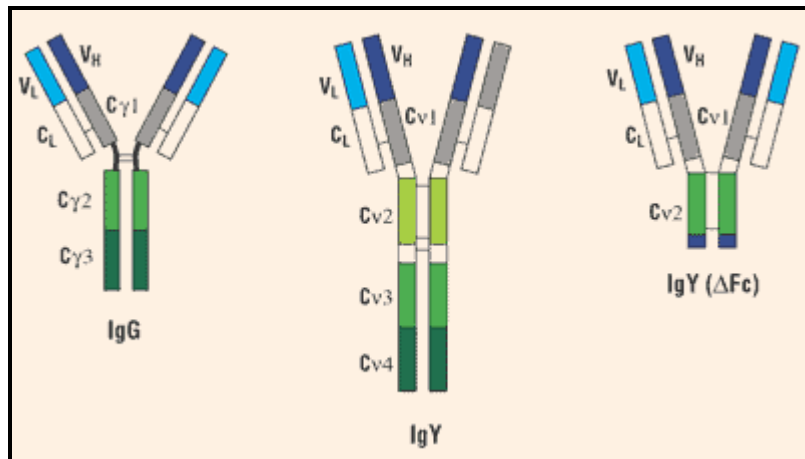


Figura 4. Diferencias estructurales entre IgG de mamífero e IgY aviar (Chiou, 2002).

2.5.5 Tipos de anticuerpos

- Anticuerpos policlonales

La respuesta humoral normal a un antígeno significa que muchas células B son estimuladas para producir anticuerpos frente a un antígeno complejo. Sólo un número concreto de inmunoglobulinas están dirigidas frente a un determinante antigénico (epítipo). El antisuero resultante es una mezcla de diferentes anticuerpos sintetizados por numerosos clones de linfocitos B que pueden responder a diferentes porciones (epítipos) de un antígeno y se conocen como anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos no son reproducibles porque son la suma de muchos anticuerpos producidos por un animal en un tiempo concreto (Madigan *et al.*, 2004; Abbas y Lichtman, 2004).

- Anticuerpos monoclonales

Cada inmunoglobulina es producida por una sola célula B y una célula B clonada puede producir *in vitro* cantidades ilimitadas de una inmunoglobulina específica. Los anticuerpos monoclonales son productos de clones de células únicas. Los clones de células B pueden guardarse y congelarse, y luego pueden ser reactivados proveyendo una fuente inagotable de anticuerpos específicos (Madigan *et al.*, 2004).

2.5.6 Comparación entre IgG de mamíferos e IgY aviar

Los anticuerpos policlonales son comúnmente producidos en mamíferos como conejos, hámsters, cabras, ovejas y caballos. Estos animales son buenos productores de anticuerpos pero presentan algunas dificultades: las dos primeras especies mencionadas, que son las más usadas, generan cantidades reducidas de suero y las otras tres no son comúnmente usadas debido a la dificultad de hospedaje por su talla, alto costo de la dieta y difícil manipulación (Alarcón *et al.*, 2000). El uso de gallinas en la producción de anticuerpos también representa un refinamiento y una reducción en el uso de animales puesto que las gallinas producen gran cantidad de anticuerpos (Schade *et al.*, 1996).

Además, en el caso de proteínas de mamíferos altamente conservadas que se comportan como inmunógenos débiles, es difícil obtener una respuesta inmune humoral en animales como conejos y hámsters, así que una mayor distancia filogenética entre las especies involucradas ofrece mayor potencial para producir altos porcentajes de anticuerpos específicos contra estos antígenos. En consecuencia, se ha demostrado que la inmunización de aves representa una herramienta poderosa para obtener anticuerpos contra esta clase de proteínas (Alarcón *et al.*, 2000; Warr *et al.*, 1995).

Las aves tienen un buen desarrollo del sistema inmune tanto humoral como celular y normalmente tienen grandes concentraciones de anticuerpos en el suero y aún más en la yema del huevo, pues las hembras transfieren anticuerpos sanguíneos a los huevos durante su período de maduración en el oviducto y así proveen de una fuente de anticuerpos para los polluelos en caso de ocurrir una fecundación, de manera similar a como ocurre con el transpaso de los anticuerpos a través de la placenta en los mamíferos (Alarcón *et al.*, 2000).

Las moléculas IgY de gallina tienen algunas características fisicoquímicas que las diferencian de las IgG de mamífero. Por ejemplo, no interactúan con factores reumatoideos, no activan el sistema de complemento humano, no se unen a la proteína A estafilocócica, no se unen a la proteína G ni tampoco a los receptores Fc de las células de mamíferos, de tal manera que la probabilidad de dar falsos positivos en ensayos inmunológicos disminuye (Alarcón *et al.*, 2000; Gatica *et al.*, 2004).

Normalmente, para la producción de suero hiperinmune en mamíferos, se hacen inoculaciones periódicas con el antígeno y el adyuvante. Adicionalmente, se deben hacer sangrías para evaluar cualitativa y cuantitativamente el título de anticuerpos específicos contra el antígeno, lo que implica mayor trauma y estrés para el hospedero. Por último, si se quiere obtener gran cantidad de suero, se necesita sacrificar al animal para recolectar toda la sangre por punción cardíaca (Alarcón *et al.*, 2000).

La obtención de anticuerpos a partir de yemas de los huevos de gallinas inmunizadas es un método menos invasor, es una alternativa interesante, pues omite las punciones intra-venosas necesarias para obtener suero. En este caso, la toma de muestras para el seguimiento del título se limita a la simple recolección de los huevos de la gallina inmunizada. La producción de

anticuerpos a gran escala en gallinas está asociada, además, a ventajas de tipo económico (Alarcón *et al.*, 2000; Gatica *et al.*, 2004).

Las principales diferencias entre la IgY aviar y la IgG de mamíferos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Comparación de las características de IgG de mamíferos e IgY aviar (Schade *et al.*, 1996).

	IgG Mamíferos	IgY Aviar
Muestreo de anticuerpos	Método invasivo	Método no invasivo
Cantidad de anticuerpos	200 mg IgG por sangrado (40 ml sangre)	50-100 mg IgY por huevo (5-7 huevos por semana)
Cantidad de anticuerpos por mes	200 mg	1500 mg o más
Cantidad de anticuerpos específicos	5 % o más	2-10 %
Unión a la proteína A/G	Si	No
Interferencia con IgG mamífera	Si	No
Interferencia con el factor reumatoideo	Si	No
Activación de complemento mamífero	Si	No

2.6 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Se debe tener claro cual es la técnica en la que se van a emplear los anticuerpos con el fin de determinar el grado de pureza y que los reactivos que se emplean en la extracción y en la purificación no intervengan en la técnica final. La correcta escogencia en el método de purificación depende de un número de variables que incluye: el uso de los anticuerpos, la especie

del animal con el que se trabaja, el tipo de anticuerpo y la obtención de los mismos (Pinto, 2001).

Entre las técnicas de purificación más usadas se encuentran las siguientes: precipitación con sulfato de amonio, purificación con ácido caprílico, purificación usando DEAE-matriz, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel de afinidad, purificación por gel filtrador, electroforesis de agarosa y ultracentrifugación (Harlow, 1988).

2.6.1 Precipitación con sulfato de amonio

Cuando se encuentran altas concentraciones de sal, las proteínas tienden a agregarse y a precipitar. Esta técnica se conoce como “salting out”. Las proteínas precipitan a diferentes concentraciones de sal, por eso se utiliza como un método de purificación de proteínas (Bollag, 1996). Es un método que se utiliza cuando se trabaja a gran escala (1-5 L de homogenizado). Las proteínas de la solución son precipitadas a una concentración elevada de sal. Esto parte del hecho de que la superficie de las proteínas tiende a tener partes hidrofóbicas, que en solución, son rodeadas por moléculas de agua. Cuando la sal se adiciona a la solución de proteínas, el agua es atrapada para solvatar los iones de la sal disociada, lo cual expone progresivamente las regiones hidrofóbicas de la superficie de las proteínas. Estas partes hidrofóbicas empiezan a interactuar, conduciendo a la agregación y finalmente a la precipitación de las proteínas de la solución (Doonan, 1996).

En soluciones salinas muy concentradas, gran parte del agua que normalmente solvataría y ayudaría a solubilizar la molécula de proteína está enlazada en las capas de hidratación de numerosos iones salinos, impidiendo una hidratación suficiente de la proteína. Así, con concentraciones salinas muy altas, la solubilidad de una proteína disminuye

de nuevo (Mathews *et al.*, 2004). Los requerimientos de la sal utilizada incluyen: elevada solubilidad, versatilidad del pH, que los iones que la componen sean inocuos para las proteínas y bajo costo, por esto, el sulfato de amonio es utilizado puesto que está entre las sales que satisfacen estas características (Donan, 1996; Bollag, 1996).

La técnica consiste en la precipitación de las proteínas en solución mediante la adición de sulfato de amonio, precipitando las proteínas por centrifugación, resuspendiendo en una mínima cantidad de agua o tampón, y removiendo el sulfato de amonio residual por diálisis. Así, una segunda técnica para la concentración de las proteínas, que es aplicable en los pasos finales de los protocolos de purificación, es la utilización de diálisis. Si la solución con proteínas es puesta en una bolsa y se aplica una presión, las moléculas pequeñas salen y las moléculas de proteína son retenidas. Pero, excepto para volúmenes pequeños, este método requiere mucho tiempo (Doonan, 1996; Bollag, 1996).

2.6.2 Kit comercial de extracción de IgY EGGstract IgY Purification System® de PROMEGA

Las IgY purificadas utilizando el sistema de purificación EGGstract IgY Purification System® de Promega son apropiadas para procedimientos inmunológicos estándar. Este sistema de purificación es un método rápido y simple para el aislamiento de IgY total de yema de huevo de gallina. Utilizando este sistema se produce IgY total con una sola precipitación entre un rango de 55 a 80 mg, del 75 % de IgY pura por huevo. Una segunda precipitación, incrementa la pureza alrededor del 90 % (Haak-Fredscho, 1994).

2.7 SEROLOGÍA

El estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro* es denominada serología. Las reacciones serológicas son la base de los tests de serología diagnóstica. La interacción específica se basa en el reconocimiento de la variedad antigénica por las regiones variables de los anticuerpos. Es así como una variedad de tests serológicos son usados para identificar antígenos. El uso de estos tests es dependiente de la sensibilidad y especificidad. La especificidad es la habilidad de reconocer un antígeno individual. Un óptimo nivel de especificidad requiere que el anticuerpo reconozca un solo antígeno que no tenga reactividad cruzada con otro antígeno, lo que daría falsos positivos. La especificidad debe medirse de acuerdo con el control positivo y negativo del antígeno. La sensibilidad define la menor cantidad de antígeno que puede ser detectado. El más alto grado de sensibilidad requiere que una sola molécula de antígeno sea detectada. La alta sensibilidad previene que reaccionen falsos negativos. La cantidad de antígeno detectado es proporcional a la cantidad de anticuerpo utilizado (Madigan *et al.*, 2004).

2.7.1 Caracterización de anticuerpos

2.7.1.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

La unión covalente de las enzimas a los anticuerpos da lugar a una herramienta inmunológica que posee a la vez una alta especificidad y sensibilidad. La técnica de ELISA (del inglés enzyme-linked immuno-sorbent assay; ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas; de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos. Las enzimas de unión típicas incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y B-

galactosidasa, que catalizan reacciones cuyos productos son coloreados y pueden medirse en cantidades muy pequeñas (Madigan *et al.*, 2004).

Se usa un reactivo de entrecruzamiento para acoplar covalentemente una enzima a un anticuerpo que se utiliza para analizar una sustancia concreta. La enzima elegida es una cuya actividad pueda determinarse con facilidad con una técnica espectrofotométrica. Aunque este método tiene muchas variaciones, el principio es analizar los anticuerpos unidos midiendo la actividad de la enzima conjugada (Mathews *et al.*, 2004).

Se han desarrollado dos metodologías de ELISA, una para la detección del antígeno (ELISA directo) y otra para la detección de anticuerpos (ELISA indirecto). En el ELISA directo, el antígeno es atrapado entre dos capas de anticuerpo. La muestra se añade a los posillos de una placa de microtitulación previamente recubierta con anticuerpos específicos para el antígeno que quiere detectarse. Si el antígeno se halla presente en la muestra, quedará atrapado en los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos. Después de eliminar mediante lavado el material no unido, se añade un segundo anticuerpo con la enzima conjugada. Este segundo anticuerpo también es específico para el antígeno, de tal forma que se une a cualquiera de los determinantes restantes expuestos. Después del lavado, la actividad de la enzima del material unido en cada posillo de microtitulación se determina añadiendo el sustrato de la enzima. El color que se forma es proporcional a la cantidad de antígeno presente (Madigan *et al.*, 2004).

2.7.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS es un método rápido, reproducible y de bajo costo para cuantificar, comparar y caracterizar

proteínas. Este método separa las proteínas basado principalmente en su peso molecular. El SDS se une a las partes hidrofóbicas de las proteínas, rompiendo su estructura enrollada y permitiendo que permanezca estable en solución en una conformación abierta. Como resultado, la longitud del complejo de SDS-proteína es proporcional a su peso molecular. La facilidad de la ejecución y la gran aplicación de la SDS-PAGE ha hecho de ésta una importante técnica analítica (Bollag, 1996).

Cuando las proteínas son desnaturalizadas por el SDS, cuanto más grandes son más se unen al SDS y más cargas negativas adquieren. Por eso, las proteínas de tamaño diferente pueden separarse por electroforesis en gel como el de poliacrilamida sobre la base de su carga global (Roiit, 2003). Entre los usos de esta técnica se encuentran: análisis de pureza de proteínas, determinación del peso molecular de las proteínas, verificación de la concentración de proteínas, detección de proteólisis, identificación de proteínas inmunoprecipitadas, primer paso en inmunoblotting, detección de proteínas modificadas, separación y concentración de proteínas de antígenos para la producción de anticuerpos, entre otros (Bollag, 1996).

2.7.1.3 Inmunotransferencia (Western blot)

Es una técnica analítica útil para caracterizar proteínas, determina la presencia y el tamaño de una proteína en una muestra biológica. Se emplea para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, las que reaccionan con el mismo anticuerpo. En esta técnica, se analizan las proteínas que reaccionan con el anticuerpo en una mezcla separando primero las proteínas de dicha mezcla mediante una electroforesis en gel desnaturalizante; con frecuencia se emplean geles 2-D, de manera que cada componente se resuelva en una banda aparte (Tizard, 2002; Mathews *et al.*, 2004; Abbas y Lichtman, 2004).

Tras la electroforesis, el gel se pone en contacto con una hoja de nitrocelulosa, y las proteínas se transfieren a la nitrocelulosa mediante una corriente eléctrica. Las proteínas quedan unidas de manera irreversible a la hoja de nitrocelulosa, con lo que las reacciones antígeno-anticuerpo pueden observarse después de tratar la hoja con un anticuerpo. La visualización se realiza por medio de inmunoanálisis enzimático o de radioinmunoanálisis con el empleo de un anticuerpo marcado radiactivamente con yodo 125, seguido de autoradiografía, o bien con una forma de la técnica ELISA (Tizard, 2002; Mathews *et al.*, 2004). Cuando se utiliza la valoración enzimática, primero se incuba la membrana en antisuero específico. Después del lavado, se agrega una solución de antiglobulina marcada con enzimas. Cuando ésta se extrae por lavado, se añade un sustrato, con lo que se colorean las bandas donde el anticuerpo se unió con el antígeno. Cuando se utiliza antiglobulina marcada con isótopos, debe hacerse una autorradiografía; la banda marcada se identifica por el oscurecimiento de una emulsión fotográfica (Tizard, 2002).

2.7.1.4 Ensayo en gota (Dot blot)

Es una especie de ELISA rápido que utiliza como soporte sólido papel de nitrocelulosa. Es una prueba rápida, específica, sensible, es fácil de realizar y es usada normalmente en estudios cualitativos (Eamsobhana *et al.*, 2004). El antígeno en general se adsorbe pasivamente (blotting) al soporte en forma de gota (dot). Las pruebas de dot-blot son fáciles de realizar, rápidas y la mayoría arroja resultados en pocos minutos. En general, se utilizan conjugados de anti-inmunoglobulina ligados a una enzima que se fijan a los anticuerpos y la adición de sustrato permite la visualización del color en el papel (Tizard, 2002).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Con el ánimo de reemplazar los insecticidas químicos en el control de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*), plaga que afecta significativamente la producción de papa en nuestro país, se ha venido implementando la utilización de un granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) proveniente del Perú como una alternativa eficiente y sostenible a nivel ambiental.

Sin embargo, considerando las ventajas de utilizar organismos nativos adaptados a los ecosistemas donde serán aplicados y aislados del mismo hospedero a controlar, CORPOICA ha realizado un reconocimiento y colección de aislamientos nativos de granulovirus a partir de *T. solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae), a los cuales les ha realizado tinción con azocarmin G, pruebas de microscopía electrónica y microscopía de campo oscuro, que sugieren que estos aislamientos pertenecen al grupo de los granulovirus, sin embargo, es necesario confirmar la identidad de éstos mediante otras técnicas. Las técnicas de identificación molecular disponibles son costosas y dispendiosas, por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar otras técnicas confiables, específicas y económicas. Dichas técnicas también serán de gran utilidad para realizar el control de calidad de los productos desarrollados a base de estos aislamientos.

3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El cultivo de la papa durante muchos años se ha visto afectada por la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae), la cual

ha sido combatida ineficientemente con diferentes insecticidas químicos. Por tal razón, desde hace varios años se ha venido trabajando en el desarrollo de una alternativa de control biológico eficiente mediante el uso de un bioplaguicida a base de granulovirus.

Al no contar nuestro país con un aislamiento nativo de granulovirus, se inició el manejo de la polilla con un granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) aislado del Perú. Sin embargo, CORPOICA en el año 2004 inició la búsqueda de aislamientos nativos de granulovirus en diferentes zonas productoras de papa en el país. Hasta el momento se han encontrado cinco posibles aislamientos de granulovirus, a los cuales se les debe confirmar la identidad con miras al desarrollo de un bioplaguicida.

Existen diferentes métodos para la detección de Baculovirus en cultivos celulares, tejidos o larvas infectadas, sin embargo, la mayoría se basan en la amplificación de genes por PCR o análisis de DNA por RFLP-PCR, métodos que resultan muy costosos. Asimismo, la microscopía electrónica puede ser usada, pero esta técnica requiere tiempo y es muy costosa. Por tal motivo, contar con anticuerpos policlonales contra el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) del Perú el cual ha sido identificado mediante secuenciación de su genoma y comparación con las bases de datos del Genbank, permitiría desarrollar métodos inmunológicos que facilitarían la identificación de los diferentes granulovirus aislados por CORPOICA y permitiría llevar a cabo el control de calidad de productos formulados a base de ellos, ya que una prueba como la de ELISA resulta ser el método más apropiado para una detección y cuantificación de rutina en laboratorio.

La producción de los anticuerpos requeridos para desarrollar la técnica de ELISA puede realizarse en distintas especies, obteniéndose diferentes títulos

de anticuerpos y calidad de ellos. Por tal razón, se pretende también en este trabajo comparar la eficiencia en la producción de los anticuerpos policlonales tanto en conejos como en gallinas para determinar en cual de las dos especies se obtiene el mejor rendimiento y especificidad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica inmunológica para la identificación de granulovirus nativos aislados de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar un sistema eficiente para la producción de anticuerpos policlonales contra granulovirus.
- Desarrollar una técnica inmunológica para la identificación de granulovirus.
- Confirmar la identidad de los aislamientos nativos de granulovirus de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) mediante la prueba inmunológica desarrollada.

5. METODOLOGÍA

5.1 Propagación del virus

Fragmentos de papel filtro con posturas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) se inocularon con una suspensión del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) proveniente del Perú y posteriormente los huevos se colocaron sobre tubérculos de papa pastusa ubicados en cubetas plásticas, las cuales se taparon con muselina. Después de 20 días se realizó un análisis destructivo de los tubérculos, se extrajeron las larvas y se clasificaron de acuerdo a la presencia o ausencia de síntomas de la infección viral, seleccionando aquellas larvas que presentaban un color blanco lechoso típico de la enfermedad (Villamizar *et al.*, 2006).

5.2 Purificación del virus

Se tomaron 100 larvas de *Tecia solanivora* infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* proveniente del Perú y se maceraron en 5 ml de tampón TRIS 0.1 M pH 7.5. Posteriormente, el macerado obtenido fue clarificado mediante filtración por muselina para retirar el tejido grueso del insecto. El líquido obtenido se pasó por un filtro millipore con una membrana de 0.8 μm y al filtrado se le adicionaron 2 ml de SDS 0.5% (p/v), mezcla que se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos y se tomó el sobrenadante. Éste se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos y se tomó el sedimento, el cual se resuspendió en 0.5 ml de tampón TRIS pH 7.5 y se llevó a un colchón de glicerol (30% y 80% P/P). El colchón se centrifugó a 15000 rpm por una hora y se tomó la banda blanca de virus purificado que se formó entre las dos concentraciones. Esta banda se resuspendió en 5 ml de tampón TRIS pH 7.5 y se centrifugó a 15000 rpm por 20 minutos. El sedimento se resuspendió

nuevamente en tampón y se congeló en nevera a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que fue utilizado (Comunicación personal Carlos Espinel, 2005) (Anexo I).

5.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se determinó la cantidad de proteína antigénica total con la que se contaba, es decir, la concentración del granulovirus del Perú expresada en μg de proteína por ml, para esto se realizó una curva de calibración por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para realizar la curva de calibración se preparó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$, para la que se pesaron 0.025 g de BSA y se llevaron a 25 ml con $\text{NaCl } 0.15\text{ M}$. A partir de esta solución se prepararon diferentes concentraciones de albúmina en $\text{NaCl } 0.15\text{ M}$ ($0, 20, 30, 40, 60$ y $80\text{ }\mu\text{g/ml}$). Posteriormente, se tomaron 10 tubos para cada concentración (estériles y secos) y se les adicionó 1 ml de solución de cada una de estas concentraciones. En cada tubo se adicionaron 2 ml del reactivo de Bradford (Anexo II) teniendo la precaución de proteger los tubos de la luz. Se leyó la absorbancia de cada tubo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y el blanco consistió en $\text{NaCl } 0.15\text{ M}$ más el reactivo de Bradford. Cada concentración de proteína contó con diez réplicas. Finalmente, se realizó el análisis estadístico utilizando tanto el programa STATISTIX como la prueba F de Fischer y se halló la ecuación de la recta con la que se construyó la curva de calibración.

Para hallar la concentración del virus expresado como μg de proteína por ml se tomaron $10\text{ }\mu\text{l}$ del granulovirus del Perú puro y se adicionaron a $9990\text{ }\mu\text{l}$ de $\text{NaCl } 0.15\text{ M}$. Posteriormente, se tomaron tres tubos estériles y se les adicionó a cada uno 1 ml de la suspensión anterior. Se adicionaron 2 ml del reactivo de Bradford y se leyó la absorbancia de cada tubo en el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para determinar la concentración en cada tubo en $\mu\text{g/ml}$ se reemplazaron los datos de absorbancia en la ecuación de la curva de calibración elaborada previamente.

5.4 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de gallinas

5.4.1 Inoculación de las gallinas

La inoculación se realizó en una gallina de dieciséis semanas de edad vía intramuscular. Se inyectó un volumen final de mezcla virus / adyuvante (completo o incompleto según el esquema de inoculación) de 1 ml (0.5 ml al lado izquierdo de la pechuga y 0.5 ml al lado derecho) (Pinto, 2001). Para tal fin, se descongeló el virus purificado y se diluyó en suero fisiológico incorporando 9 ml de éste en cinco tubos de 16 X 100. Al primer tubo se le adicionaron 20 μl del virus puro y se realizaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Posteriormente, se halló la concentración de virus en cada tubo midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm y extrapolando el resultado en una curva de calibración previamente establecida que relaciona la concentración de partículas virales con la absorbancia (Gómez, 2005), lo cual permitió determinar la concentración en cada tubo y así se preparó el inóculo ajustando la concentración final a 2.46×10^7 CI/ml, la que equivalió a 9.2 μg de proteína total soluble por ml según la curva de calibración de proteína total elaborada previamente.

Esquema de inoculación:

Día 0: 0.5 ml de virus + 0.5 ml de adyuvante completo de Freund.

Día 17: 0.5 ml de virus + 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund.

Día 30: 1 ml de virus.

5.4.2 Purificación de los anticuerpos mediante deslipidación y precipitación de proteínas

Para este procedimiento se utilizó el kit comercial de extracción de IgY EGGstract IgY Purification System de PROMEGA. Se tomaron 21 ml de yema y se colocaron en agitación constante con un magneto y lentamente se le agregaron 63 ml de solución A, se dejó en agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 4000 gravedades por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una gasa estéril y el filtrado se colectó en un vaso de precipitados, el cual se agitó con una barra magnética mientras se le adicionaban lentamente 21 ml de solución B y se dejó en agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4000 gravedades por 10 minutos a 4°C para obtener el precipitado. Los últimos 3 pasos se repitieron una vez más para obtener una pureza del 95% de la inmunoglobulina IgY y el precipitado obtenido se guardó a -20°C (Haak-Frendscho, 1994).

5.5 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de conejos

5.5.1 Inoculación de los conejos

La inoculación se realizó en dos conejos de raza Nueva Zelanda de cuatro meses de edad vía intramuscular, se inyectó un volumen final virus / adyuvante de 0.7 ml en la pierna de los animales. La concentración del virus y el esquema de inoculación fueron iguales a los utilizados en el protocolo para la obtención de anticuerpos policlonales a partir de gallina.

5.5.2 Purificación de los anticuerpos

A los quince días de la última inoculación se sangraron en blanco los conejos mediante punción cardiaca. Se dejó coagular la sangre toda la noche y al día siguiente se tomó la mayor cantidad de suero posible (28.5 ml) el cual se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos y así se obtuvo un suero más puro. Luego, se precipitaron las proteínas tomando todo el volumen de suero obtenido y agregando igual volumen de sulfato de amonio al 80% de saturación para obtener una concentración final del 40%. Se colocaron en agitación lenta toda la noche a 4 °C y se centrifugó a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 5 ml de PBS y se dializó con tampón de cloruro de sodio (NaCl 0.15 M, pH 7.2) por 24 horas, cambiando el tampón de diálisis periódicamente (González *et al.*, 2002; Merlín *et al.*, 2001; Bollag, 1996).

5.6 Determinación de la pureza del antígeno por SDS-PAGE

Se preparó una solución de acrilamida-bisacrilamida al 29% de acrilamida (p/v) y al 1% de bisacrilamida (p/v). Se preparó el gel separador al 10% teniendo en cuenta un volumen final de 10 ml. El gel se preparó de la siguiente manera: se adicionaron 3,3 ml de acrilamida-bisacrilamida; 1,25 ml de Tris-HCl 1.5 M pH 8,8; 0,1 ml de SDS (lauryl sulfato sódico) 10% (p/v); 5,5 ml de agua bidestilada; 0,4 ml de APS (persulfato amónico) 10% (p/v) y 0,09 ml de TEMED (N,N,N',N',-tetrametil-etilendiamina).

Se adicionó lentamente la mezcla con una micropipeta por el interior de los cristales de la cámara de electroforesis hasta aproximadamente 1 cm del extremo inferior del peine, evitando la formación de burbujas. Se mantuvo el gel en posición vertical a temperatura ambiente por 20 minutos mientras se daba la polimerización. Luego se preparó el gel de apilamiento a un volumen

final de 10 ml. Para este gel se mezclaron: acrilamida-bisacrilamida 2,5%; Tris-HCl 1 M pH 6,8; SDS 10%; TEMED 0,1% y APS 10%.

Se adicionó la mezcla de acrilamida líquida correspondiente al gel de apilamiento sobre la fase anterior del gel ya polimerizado con ayuda de una micropipeta y se colocó el peine. Una vez polimerizó el gel de apilamiento, se montó el gel sobre el soporte de electroforesis y se añadió el tampón de corrida (1x), que consiste en Tris 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 10% (p/v) pH 8,3; llenando todo el tanque.

Se tomaron 7 µl de virus del Perú puro el cual se utilizó para la producción de los anticuerpos, virus del Perú purificado en otra fecha, el aislamiento VG001, macerado de larva sana y un nucleopoliedrovirus, y se mezclaron cada uno con 5 µl de tampón de carga, que consistió en Tris-HCl 125 mM; SDS 2% (p/v) pH 6,2; glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,004% (p/v) y 2-mercaptoetanol 5% (v/v); lo cual se hirvió por tres minutos. Posteriormente, se cargaron las muestras en los pocillos del gel. Se cerró el tanque y se conectó a la fuente de voltaje. La corrida se realizó a intensidad constante a 140 voltios durante aproximadamente una hora. Una vez que el frente llegó al fondo del gel se desconectó la fuente de voltaje y se desmontaron los soportes para recuperar el gel. Se introdujo el gel en un recipiente con solución colorante (azul brillante de Commassie R 0,1% p/v; ácido acético 10% v/v y etanol 50% v/v), se llevó al microondas por un minuto y luego se mantuvo en agitación durante 15 minutos para asegurar una tinción homogénea. Posteriormente, se introdujo el gel en un recipiente con solución decolorante (etanol 9,45% y ácido acético 6,75%), se llevó al microondas por un minuto y luego se mantuvo en agitación durante toda la noche (Laemmli, 1970; Caballero *et al.*, 2001).

5.7 Determinación de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno

Para determinar la afinidad de los anticuerpos por el antígeno se realizó la prueba de Dot blot. Para tal fin se utilizó como antígeno el virus purificado anteriormente (granulovirus del Perú) y como control negativo, la hemolinfa de una larva sana.

Se tomaron dos membranas de nitrocelulosa, una para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo y la otra para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina. A cada membrana se le adicionó por triplicado el antígeno y el control negativo también por triplicado. Las membranas se sumergieron en tampón de transferencia durante 15 minutos dejándolas secar posteriormente. En seguida, se aplicaron 6 μ l del antígeno (22.4 μ g/ml) y 6 μ l del control negativo y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente.

Las membranas se lavaron una vez con solución de lavado (Anexo III), se bloquearon con tampón de bloqueo (Anexo III) durante una hora a 37°C y se lavaron nuevamente tres veces. Inmediatamente, se adicionaron los anticuerpos purificados a partir de conejo o de gallina en una dilución de 1:100 y se incubaron por una hora a 37°C manteniendo en agitación. A continuación las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado manteniéndolas en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionó tampón de bloqueo durante media hora y se realizó un lavado.

Las membranas se incubaron con el conjugado en una dilución 1:5000, se dejaron en agitación constante por 1 hora a 37°C y después se lavaron tres veces con tampón de lavado dejándolas allí 15 minutos y cambiando cada 5 minutos el tampón. En seguida se agregaron 10 ml de reactivo cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil nitro fosfato azul tetrazolium (NBT.BCIP. Ref. SIGMA

N-2765) y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS. Ref. SIGMA P4417) (Eamsobhana *et al.*, 2004; Gatica *et al.*, 2004; Afanador y Barco, 2002).

5.8 Reconocimiento de la proteína antigénica viral

5.8.1 Electroforesis SDS-PAGE

Los geles de la electroforesis se prepararon como se describió en el numeral 5.6 para la determinación de la pureza del antígeno. Posteriormente, se tomaron 5 µl de macerado de larvas infectadas (las cinco cepas nativas y la del Perú), se mezclaron con 5 µl de tampón de carga y se hirvieron por tres minutos. En seguida, se cargaron las muestras en los pocillos del gel. Se cerró el tanque y se conectó a la fuente de voltaje. La corrida se realizó a intensidad constante a 140 voltios durante aproximadamente tres horas. Una vez que el frente llegó al fondo del gel se desconectó la fuente de voltaje y se desmontaron los soportes para recuperar el gel.

5.8.2 Western blot

Una vez realizada la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa a 100 voltios por 45 minutos, posteriormente se pasó a 15 voltios y se dejó así por 18 horas. Se tomó el papel de nitrocelulosa y se sumergió en tampón de bloqueo (Anexo III) durante una hora a 37°C y se lavó tres veces con solución de lavado (Anexo III). Enseguida, se adicionaron los anticuerpos purificados a partir de conejo o de gallina en una dilución de 1:32 y se incubó por una hora a 37°C manteniendo en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado manteniéndolas en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionó tampón de bloqueo (Anexo III) durante media hora y se realizó un lavado. Se incubaron las membranas con el conjugado en una dilución

1:5000, se dejaron en agitación constante por 1 hora a 37°C y después se lavó tres veces con tampón de lavado dejándolas allí 15 minutos y cambiando cada 5 minutos el tampón. Finalmente, se agregaron 10 ml de reactivo cromógeno (NBT.BCIP), se dejó actuar unos minutos y se lavó con PBS (Chen *et al.*, 2005; Afanador y Barco, 2002).

5.9 Titulación de anticuerpos mediante prueba de ELISA

5.9.1 Criss-cross

La prueba que se desarrolló fue una ELISA indirecta a partir de la cual se determinó la concentración óptima del antígeno (granulovirus del Perú). Se tomaron dos placas de ELISA de 96 pozos, una para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo y otra para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina. En las columnas uno a la ocho de la placa se adicionaron 50 µl del antígeno (granulovirus puro) por duplicado en las siguientes concentraciones: 250 ng/ml, 150 ng/ml, 50 ng/ml y 25 ng/ml. En las columnas nueve, diez, once y doce se adicionaron respectivamente 50 µl del virus en las concentraciones de 250 ng/ml, 150 ng/ml, 50 ng/ml y 25 ng/ml. Se incubó toda la noche a 4°C para que se adhirieran a las placas y se agregó tampón de lavado (PBS / Tween 20) (Anexo III) realizando tres lavados. En seguida se realizó un bloqueo con tampón de bloqueo (Anexo IV) durante una hora a 37 °C y se lavó tres veces con tampón de lavado.

Posteriormente, en las filas de la placa comprendidas entre la A y la H se adicionaron 50 µl de los anticuerpos purificados de conejo o de gallina en las diluciones 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048 respectivamente. Para los tratamientos blanco correspondientes a las columnas de la nueve a la doce, en lugar de anticuerpo se adicionó tampón fosfato salino (PBS). Se incubó por hora y media a 37°C y se lavó tres veces.

Se realizó un bloqueo como se describió anteriormente pero durante media hora. Luego, se agregaron 50 µl del conjugado en una dilución 1:1000 y se dejó hora y media a 37°C. Se lavó y se adicionaron 50 µl de la solución reveladora (p-nitrofenilfosfato 0.1% en dietanolamina-HCl 10% pH 9.8) (Anexo IV) en cada pozo. Las placas se llevaron a un lector de ELISA (Asys Hitech GmbH. Expert 96) y se leyó la absorbancia a 405 nm. Dicho procedimiento se repitió tres veces en el tiempo para evaluar la repetibilidad de los resultados (Afanador y Barco, 2002; Ferriol *et al.*, 1999).

5.9.2 ELISA de titulación

Una vez determinada la concentración óptima del antígeno se procedió a realizar la titulación de los anticuerpos. Se realizó una ELISA indirecta para la cual se tomaron dos placas de ELISA de 96 pozos, una para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo (IgG) y otra para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina (IgY). Se adicionaron 50 µl del antígeno (granulovirus del Perú) en los 96 pozos de la placa a la concentración óptima de virus definida previamente mediante la prueba de Criss-cross. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C para adherir el antígeno y se agregó tampón de lavado (PBS / Tween 20) realizando tres lavados. Posteriormente se realizó un bloqueo con tampón de bloqueo (Anexo IV) durante una hora a 37°C y se lavó tres veces con tampón de lavado.

De la columna uno a la ocho se adicionaron respectivamente 50 µl de los anticuerpos purificados a partir de conejo o de gallina en las siguientes diluciones: 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048. Para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina se evaluaron los huevos de los días 15 y 30 post-inoculación ubicando de la fila A a la D los del día 15 y de la fila E a la H los del día 30. En las columnas 9 y 10 se ubicaron diluciones de IgY purificadas de un huevo de una gallina no inmunizada y diluciones del suero

de la sangre de un conejo no inmunizado como controles negativos. En las columnas 11 y 12 de las placas se adicionó PBS en lugar de anticuerpos como blanco. Las placas se incubaron por hora y media a 37°C y se lavaron tres veces. En seguida se realizó un bloqueo como se describió anteriormente pero durante media hora y se siguió el mismo procedimiento descrito en la metodología del Criss-cross, numeral 5.9.1.

5.10 Identificación de los aislamientos nativos

Una vez se determinó cuales eran las concentraciones de anticuerpo óptimas para trabajar se realizó una ELISA en sandwich para identificar los aislamientos nativos (las cinco cepas aisladas de diferentes departamentos del país) (Villamizar *et al.*, 2006). Estos granulovirus se purificaron a partir de las larvas de la misma manera como se describió previamente para el del granulovirus del Perú, numeral 5.2.

Se tomó una placa de ELISA de 96 pozos y se adicionaron 50 µl de IgY purificadas a partir de gallina en una dilución de 1:128 excepto en la columna doce que correspondió al blanco, en la cual se adicionaron 50 µl de virus del Perú a una concentración de 200 ng/ml. La placa se incubó toda la noche a 4°C para que se adhirieran los anticuerpos y se agregó tampón de lavado (Anexo IV) realizando tres lavados. En seguida se realizó un bloqueo con tampón de bloqueo (Anexo IV) durante una hora a 37 °C y se lavó tres veces con tampón de lavado. Posteriormente, de las columnas uno a la cinco se adicionaron 50 µl de los antígenos (aislamientos nativos): VG005, VG002, VG001, VG004 y VG003 respectivamente a una concentración de 200 ng/ml. En la columna seis se adicionaron 50 µl del virus del Perú como control positivo. De las columnas siete a la once se adicionaron, 50 µl de un nucleopoliedrovirus (NPV), macerado de larva sana proveniente de la cría básica de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Laboratorio de

entomología, CORPOICA - Tibaitatá), hemolinfa de una larva proveniente de la cría, macerado de una larva sana proveniente de campo (CORPOICA, Tibaitatá) y hemolinfa de una larva proveniente de campo, respectivamente. En la columna doce se adicionaron 50 µl de PBS para el blanco. La placa se incubó por dos horas a 37 °C y se lavó tres veces.

A continuación, se adicionaron 50 µl de IgY purificadas a partir de gallina en una dilución de 1:128 excepto en la columna correspondiente al blanco. La placa se incubó por dos horas a 37°C y se lavó tres veces. Luego, se agregaron 50 µl del conjugado (anti-gallina) en una dilución 1:1000 y se dejó dos horas a 37°C. Se realizó un lavado y se adicionaron 50 µl de la solución reveladora (p-nitrofenilfosfato 0.1% en dietanolamina-HCl 10% pH 9.8) en cada pozo. Por último la placa se llevó a un lector de ELISA (Asys Hitech GmbH. Expert 96) y se leyó la absorbancia a 405 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Propagación y purificación del virus

Las larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) evidenciaron la infección causada por granulovirus, considerando que presentaron síntomas típicos de la enfermedad como color blanco lechoso, mínima movilidad, lisis de tejido y retardo en el crecimiento. Este cambio de coloración se debe principalmente a la acumulación de cuerpos de inclusión en los tejidos afectados y debido a que las larvas no poseen una cutícula muy pigmentada se puede observar con mayor facilidad esta característica (Caballero *et al.*, 2001).

La técnica de infección de las larvas fue muy efectiva y fácil en comparación con otros métodos como la ingestión de los cuerpos de inclusión en el alimento contaminado como lo reportan Parola y colaboradores (2003) y Christian y colaboradores (2001).

Este método de propagación (*in vivo*) además de eficiente, es económico y por tal razón es ampliamente utilizado para la producción masiva de partículas virales. Cabe decir que con esta técnica se deben tener en cuenta factores como las condiciones ambientales, la temperatura y el tiempo de incubación (Caballero *et al.*, 2001). Sin embargo, hoy en día se han venido realizando diferentes investigaciones con los baculovirus debido a su importante uso en el campo de la biotecnología como vectores de expresión (Sudeep *et al.*, 2005 b; Ijkel *et al.*, 2002; Evans y O'Reilly, 1999; Markovic *et al.*, 1998) y por tal motivo, se han desarrollado un gran número de cultivos celulares para la replicación de las diferentes especies de virus que proporcionan un producto más puro (Sudeep *et al.*, 2005 a), no obstante, esta técnica resulta muy costosa.

Al final del proceso de purificación se obtuvo una banda blanca en el colchón de glicerol entre las concentraciones de 30% y 80% (Fig. 5), lo cual indica la presencia del granulovirus cuya principal proteína es la granulina que es la que genera esta coloración blanca (Caballero *et al.*, 2001; Zeddám *et al.*, 1999). Esto sugiere que el proceso de purificación aparentemente fue efectivo y según varios investigadores esta metodología de purificación no afecta la capacidad infecciosa y la persistencia del virus (Gómez, 2005). En este caso se purificó granulovirus a partir de cadáveres de insectos, lo cual requiere un proceso de purificación más estricto mientras que si se trabaja con cultivos celulares la contaminación es más reducida lo que facilita este proceso.

La purificación que se obtuvo con el empleo del gradiente de glicerol se logró gracias a la diferencia de densidades entre las diferentes macromoléculas y partículas presentes en la suspensión. La elección de las concentraciones óptimas de glicerol en el gradiente se fijan en función de la densidad de la suspensión a añadir y del grado de resolución que se desea (Chandra, 1979), lo cual fue establecido previamente por Espinel en el 2005.

Este virus purificado fue utilizado como antígeno para la obtención de los anticuerpos policlonales tanto en gallina como en conejo.

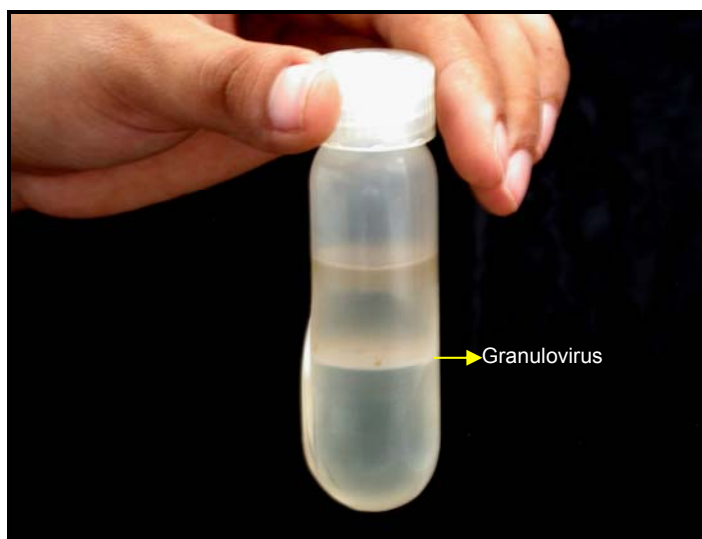


Figura 5. Gradiente de glicerol para la purificación de granulovirus.

6.2 Cuantificación de proteínas antigénicas por el método de Bradford.

Para determinar la concentración del virus, se trabajó con una curva de calibración previamente establecida que relacionaba la cantidad de cuerpos de inclusión (CI) por mililitro con la absorbancia a 450 nm (Gómez, 2005). Sin embargo, para poder hablar en términos de μg de proteína por ml se realizó una curva de calibración de proteína total soluble con el método de Bradford (Bradford, 1976). De esta forma se pudo determinar la cantidad de proteína antigénica con la que se contaba en la muestra, es decir, la concentración del granulovirus expresada en μg de proteína por ml.

Los resultados obtenidos para la curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino (BSA) (Anexo V) se sometieron a una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados con el programa STATISTIX y se trabajó con un nivel de confianza del 95%. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98 (Anexo VI), que indicó una alta correlación lineal entre los valores de

concentración y absorbancia ajustándose al modelo de una línea recta (Martínez, 1998).

Además, se realizó la prueba de Fischer con un nivel de significancia de 0.05 bajo el supuesto de que tanto las pendientes, los interceptos y los modelos de las diez curvas evaluadas eran iguales, obteniendo valores calculados de F de 0.0296 para las pendientes, 0.0228 para los interceptos y 0.0347 para los modelos, valores que se encuentran por debajo de los valores críticos de 2.21 para las pendientes, 2.12 para los interceptos y 1.93 para los modelos. Dado lo anterior se pudo determinar estadísticamente que tanto las pendientes como los interceptos y los modelos de las diez réplicas eran iguales, por lo tanto, los datos obtenidos se combinaron para obtener un modelo representado por la ecuación de una recta.

Dicha ecuación permite determinar matemáticamente concentraciones de granulovirus desconocidas mediante la lectura de la absorbancia de una muestra a 595 nm.

La ecuación obtenida fue:

$$\text{Absorbancia} = 0.0271 + 0.0138 * \text{Concentración}$$

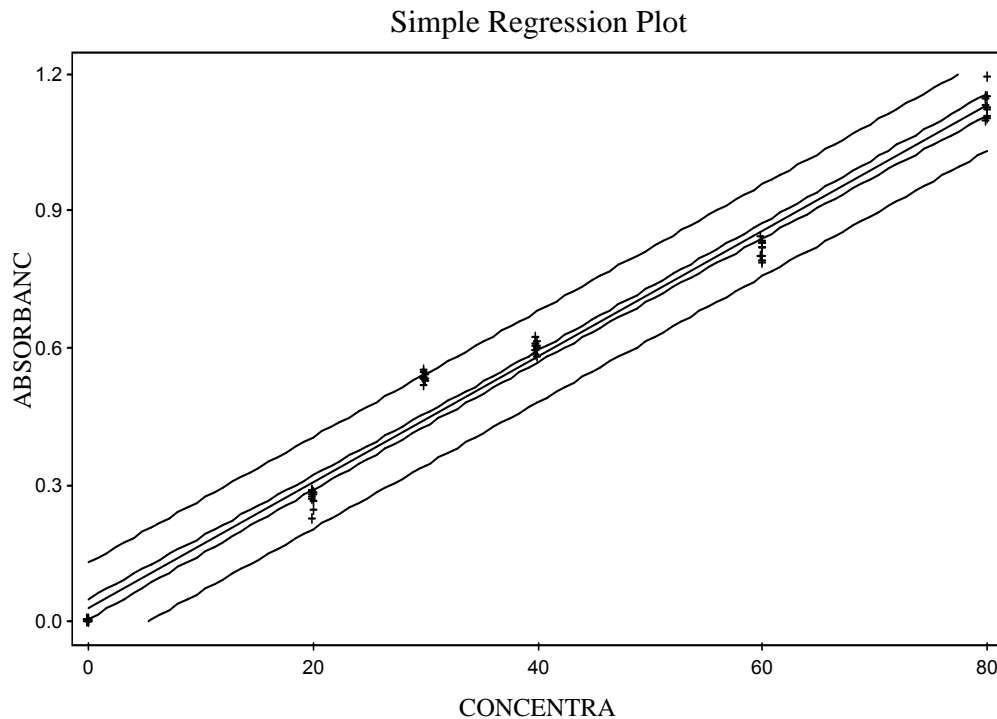


Figura 6. Curva de calibración de Bradford.

6.3 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de gallinas

El virus utilizado para la inoculación de las gallinas tuvo una concentración de $2.46 \cdot 10^7$ CI/ml (9.2 μ g/ml), la cual fue inocua para las gallinas ya que el virus no presenta tropismo por esta especie y la concentración fue la apropiada para desarrollar la respuesta inmune (Poh-Sing *et al.*, 2003). En cuanto al método de inmunización (Fig. 7), éste resultó ser fácil de realizar y no presentó mayores traumatismos para las gallinas, más allá del estrés de la manipulación del momento, hecho que se vio reflejado en el mantenimiento de la postura diaria y en la no pérdida del plumaje. Caso contrario reportaron Gatica y colaboradores (2004), quienes compararon dos vías de inoculación (intramuscular y subcutánea) para la obtención de anticuerpos policlonales en gallina a partir de fructosa-1,6-bifosfatasa de riñón de cerdo como

antígeno. Estos autores luego de la segunda inoculación, en los dos grupos de gallinas inoculadas por vía intramuscular y subcutánea, observaron un período de muda de plumas y una disminución en la producción de huevos. Lo anterior lo atribuyeron a la utilización del adyuvante, sin embargo, esto no se produjo en el presente trabajo.



Figura 7. Inoculación intramuscular en la pechuga de una gallina.

En cuanto a la purificación de los anticuerpos (IgY), el kit comercial EGGstract IgY Purification System® de Promega resultó ser un método eficiente para obtener anticuerpos con alta pureza al eliminar los lípidos y las proteínas no deseables que contienen los huevos (Haak-Frendscho, 1994), además es un método rápido, ya que en dos horas se contaba con los anticuerpos necesarios para realizar las diferentes pruebas y se evitó la implementación de protocolos dispendiosos como la precipitación con sales, precipitación por tratamiento crioetanólico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y diálisis (Alarcón *et al.*, 2000; Schade *et al.*, 1996).

En trabajos realizados previamente (Afanador y Barco, 2002; Pinto, 2001) se purificaron IgYs utilizando diferentes metodologías como la deslipidación mediante el uso de metanol-cloroformo según Wessel (1984), agua según Burdon (1987), agua-cloroformo según Svendsen (1996) y técnicas de precipitación de proteínas como la precipitación por salting-out y polietilenglicol según Johnstone (1995) (citados por Pinto, 2001). En estos trabajos se demostró que la purificación de IgYs a partir de estas metodologías se logra pero con índices de pureza menores a los obtenidos con el kit comercial y además estos procedimientos son dispendiosos y su única ventaja es la economía del proceso.

Obtener anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de gallinas es un medio económico y eficiente, hecho que a sido reconocido desde hace más de una década (Schade *et al.*, 1996; Haak-Frendscho, 1994) y ha facilitado la implementación de pruebas serológicas. Además, la especificidad de los anticuerpos producidos en gallina les da una ventaja sobre los anticuerpos producidos en mamíferos, debido a que se reduce el riesgo de que se presenten reacciones cruzadas, un solo huevo contiene alrededor de 90-100 mg de IgY totales, de las cuales aproximadamente 1-10 mg corresponde a la IgY específica que se quiere producir. No es un método invasivo considerando que los anticuerpos se purifican a partir de los huevos sin necesidad de sangrar el animal y es una fuente diaria de anticuerpos ya que las gallinas ponen mínimo un huevo por día y estos pueden ser conservados a 4 °C por un año antes de purificar las IgY (Klimentzou *et al.*, 2006; Motoi *et al.*, 2005; Alarcón *et al.*, 2000; Schade *et al.*, 1996; Haak-Frendscho, 1994).

Los anticuerpos policlonales se producen generalmente en mamíferos como conejos, hámsters, cabras, ovejas y caballos, los cuales son buenos productores de anticuerpos pero presentan algunas dificultades como la obtención de cantidades reducidas de suero y en otros casos la manipulación

y mantenimiento dispendiosos, ya sea por su talla o el alto costo de la dieta (Alarcón *et al.*, 2000). Es así como Motoi y colaboradores (2005), realizaron investigaciones para el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia directa con la cual diagnosticar en corto tiempo la presencia del virus de la rabia en un paciente, sin embargo, para la realización de esta prueba se necesitaban anticuerpos específicos para este virus, los cuales fueron producidos durante mucho tiempo en diferentes mamíferos como ratones, conejos y cabras, pero para producir cantidades suficientes de anticuerpos específicos en estos animales se requería mucho tiempo y era dispendioso, por lo tanto, cambiaron el sistema de producción y produjeron dichos anticuerpos en gallinas. Este sistema es menos riesgoso para el personal del laboratorio porque tienen que preparar menos antígeno y así manipulan menos el virus y obtienen cantidades óptimas de anticuerpo que facilitan su trabajo. Esto comprueba que la utilización de gallinas para la producción de anticuerpos es sencilla, eficiente y económica.

6.4 Producción de anticuerpos policlonales a partir de la inoculación de conejos

El virus utilizado para la inoculación de los conejos fue el mismo que se empleó para la inoculación de las gallinas y en la misma concentración. En este caso, tampoco se produjeron efectos secundarios en los animales ya que los conejos sólo sufrieron el estrés del momento de la inoculación (Fig. 8). En las horas siguientes su comportamiento no presentó cambios ya que no hubo cese en la alimentación y no se observó pérdida excesiva de pelo.



Figura 8. Inoculación intramuscular en la pierna de un conejo.

Para la obtención de los anticuerpos (IgG) a partir de conejo se extrajeron aproximadamente 65 ml de sangre, de la cual se obtuvieron 28.5 ml de suero. El proceso de extracción de los anticuerpos a partir del suero fue dispendioso y demorado con respecto a la purificación de los anticuerpos de gallina.

Aunque el empleo de conejos para la producción de anticuerpos policlonales suele ser más demorada y compleja, esta técnica se sigue realizando ya que no se justifica una completa sustitución del uso de mamíferos para la obtención de anticuerpos por anticuerpos aviares. Esto posiblemente porque las IgY son inmunológicamente distintas a las IgG y no se puede afirmar completamente que una sea mejor o peor que la otra (Schade *et al.*, 1996). Dependiendo de las necesidades, los objetivos y los recursos de los investigadores se debe elegir la técnica más apropiada. Desde hace décadas se ha venido trabajando con gallinas para producir anticuerpos, sin embargo, en algunas investigaciones se sigue trabajando con anticuerpos policlonales producidos en conejo obteniendo anticuerpos altamente específicos y con

títulos elevados (Espejo *et al.*, 2004; Agindotan *et al.*, 2003; González *et al.*, 2002; Merlín *et al.*, 2001; Okano *et al.*, 1999; Aguillon *et al.*, 1997).

6.5 Determinación de pureza del antígeno

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una herramienta útil para el análisis de las proteínas estructurales de los virus (Caballero *et al.*, 2001), pudiendo determinar su número y estimar su peso molecular. En este caso fue una técnica que se utilizó para determinar el estado inicial del antígeno con el cual fueron inoculados tanto los conejos como las gallinas. Aunque en el gel solo se evidenció una banda que presentó un peso molecular de aproximadamente 30 KDa (Fig. 9B), la cual corresponde posiblemente a la granulina, proteína que se encuentra en mayor proporción en los granulovirus y cuyo peso molecular es de aproximadamente 29 a 30 KDa (Caballero *et al.*, 2001), no se descarta la posibilidad de que también se encuentren otras proteínas en concentraciones menores que no se alcanzan a visualizar en el gel de electroforesis. Estas proteínas pueden corresponder a proteínas larvales que se presentan como contaminantes si el proceso de purificación del virus no fue completamente efectivo o también se puede tratar de otras proteínas del virus ya que los viriones de los baculovirus contienen entre 15 y 30 proteínas estructurales (Caballero *et al.*, 2001).

La obtención de un antígeno puro es de gran importancia al momento de producir anticuerpos policlonales ya que los animales inmunizados con este antígeno desarrollan una respuesta inmune frente a la molécula que se les está inoculando y el hecho de no contar con un antígeno lo suficientemente puro puede generar un gran número de anticuerpos con diferentes especificidades, lo cual contribuye a la generación de reacciones inespecíficas a la hora de realizar diferentes pruebas inmunológicas (Delgado

y González, 2000), es decir, que la pureza del antígeno influye en la producción de anticuerpos (Agindotan *et al.*, 2003).

Los investigadores a través de los años se han preocupado por estandarizar y mejorar diferentes técnicas que les permita realizar pruebas diagnósticas, control de calidad de productos y diferentes actividades de tipo biotecnológico (Parola *et al.*, 2003; Poh-Sing *et al.*, 2003; Delgado y González, 2000; Seraylán y Vargas, 1999), en estas áreas una gran herramienta han sido las pruebas inmunológicas en donde la relación antígeno-anticuerpo es fundamental. Una parte clave para el éxito de estas pruebas es la obtención de antígenos y anticuerpos puros y en óptimas condiciones ya que de la pureza y calidad del antígeno depende la sensibilidad y especificidad de pruebas como la ELISA y el desarrollo exitoso de kits comerciales (Delgado y González, 2000; Seraylán y Vargas, 1999).

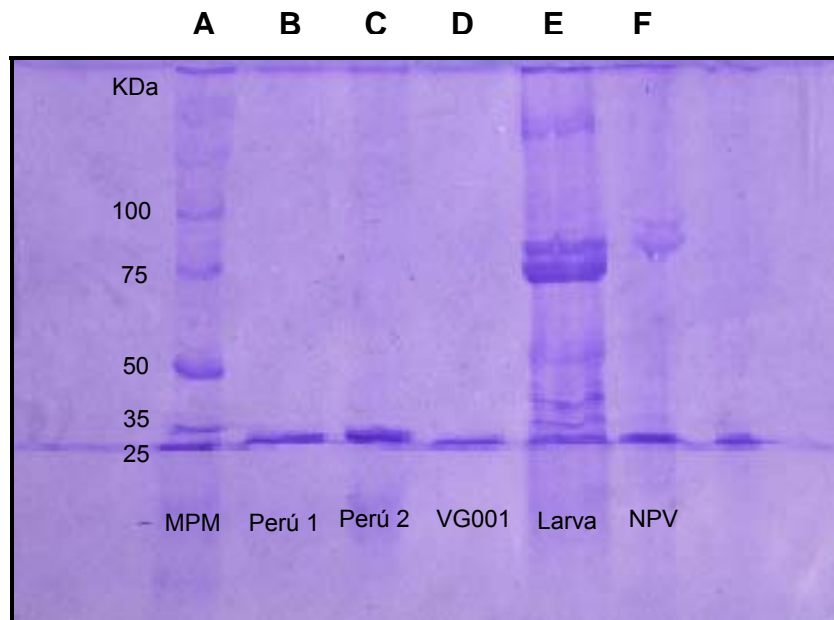


Figura 9. Electroforesis de proteínas para la determinación de pureza del antígeno: A. Marcador de peso molecular. B. Granulovirus del Perú inoculado en los animales. C. Granulovirus del Perú. D. Cepa nativa de granulovirus. E. Macerado de larva sana. F. Nucleopoliedrovirus.

6.6 Determinación de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno

Una vez se obtuvieron los anticuerpos se realizó la prueba de Dot blot para determinar si éstos tenían una alta afinidad por el antígeno (granulovirus del Perú). Al observar una coloración violeta en la membrana de nitrocelulosa se comprobó que efectivamente existía una reacción antígeno-anticuerpo tanto con los anticuerpos producidos a partir de gallina como con los producidos a partir de conejo, es decir, los anticuerpos reconocieron y se unieron al antígeno o granulovirus. Sin embargo, con la hemolinfa de larva sana utilizada como control negativo también se observó coloración violeta aunque con una menor intensidad, lo cual se pudo deber a una contaminación del antígeno inoculado en los animales con proteínas larvales y debido a que se produjeron anticuerpos policlonales, en el antisuero y en la yema de huevo podrían haber anticuerpos que reconocen algunas proteínas del insecto.

Delgado y González (2000), afirman que tanto la pureza como la calidad del antígeno afectan la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas y el lograr un alto grado de pureza puede conducir a menos reacciones inespecíficas. Además, la presencia de proteínas contaminantes tanto en el antígeno como en los anticuerpos puede producir interferencias tanto en los blancos como en los controles negativos sobre todo en las pruebas de ELISA (Klimentzou *et al.*, 2006; Eamsobhana *et al.*, 2004). En varios trabajos de obtención de anticuerpos se han producido este tipo de reacciones inespecíficas cuya contundencia debe ser evaluada para determinar si interfieren o no con lo que se está buscando. Por ejemplo, Nadala y Loh (2000) desarrollaron un protocolo para la detección de un virus que afectaba los camarones y observaron una pequeña reacción cruzada casi imperceptible con un homogeneizado de tejido de camarón normal, con el

cual se produjo una pequeña mancha en las muestras sin diluir, pero esta mancha fue tan tenue que fue considerada insignificante.

En el caso del presente trabajo es importante trabajar en la obtención de un antígeno más puro, no sólo para emplearlo en el momento de la inoculación de los animales, sino también al montar las diferentes pruebas para evitar confusiones y falsos positivos, ya que en diversos estudios se ha comprobado una elevada sensibilidad y especificidad al utilizar pruebas serológicas sobre todo cuando se cuenta con reactivos, antígenos y anticuerpos de alta calidad (Klimentzou *et al.*, 2006; Eamsobhana *et al.*, 2004). Asimismo, un factor que influye en el reconocimiento del antígeno por parte de los anticuerpos es el estado en el que se encuentre dicho antígeno, si está denaturado o no, ya que los anticuerpos se unen a éstos dependiendo de la conformación que presenten y si los epítopes que reconocen los anticuerpos no están disponibles pueda que no se presente el reconocimiento y unión del antígeno al anticuerpo (Kaba *et al.*, 2003).

Otra posible causa para este resultado podría ser que las larvas provenientes de la cría y utilizadas como control negativo podrían presentar una infección latente con un granulovirus asintomático cuyas proteínas pudieron reaccionar con el anticuerpo y dar positivo en la prueba de Dot blot. En algunas investigaciones han reportado la presencia de este tipo de infecciones, como es el caso de Hughes y colaboradores (1994), quienes encontraron en una cría de insectos de *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) una infección latente con baculovirus y demostraron, mediante una prueba de PCR, que este virus latente se encontraba durante todo el ciclo de vida del insecto, incluyendo huevos y los estados de larva, pupa y adulto. Cossentine y colaboradores (2005), también detectaron la presencia de un granulovirus en la cría de insectos de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) al

realizar una prueba de PCR, sin embargo, los síntomas típicos de la infección viral no eran frecuentes al igual que la presencia de larvas muertas.

Steinitz y colaboradores (1991) y Bosompem y colaboradores (1995) (citados por Llames *et al.*, 1999) afirman que la prueba de Dot blot permite el uso de antígenos no purificados que al igual que los antígenos puros reaccionan con los anticuerpos, lo cual es de gran ayuda al momento de realizar la búsqueda de nuevas cepas de granulovirus porque facilita la comprobación de la presencia de infección en las larvas sin necesidad de hacer otro tipo de pruebas más dispendiosas. Además, la implementación de este tipo de técnicas la han venido realizando diferentes investigadores para el diagnóstico de enfermedades en humanos y animales obteniendo muy buenos resultados (Eamsobhana *et al.*, 2004; Nadala y Loh, 2000; Llames *et al.*, 1999; Abdelmagid *et al.*, 1998).

Al comparar los anticuerpos producidos en gallina con los producidos en conejo, en relación con la intensidad del color desarrollado una vez se adicionó la solución reveladora, se observó una mayor reacción de las IgY (gallina) con el virus, lo que se evidenció en una coloración violeta más intensa (Fig. 10) en comparación con la obtenida con las IgG (conejo) que produjeron una coloración más tenue (Fig. 11). Este resultado posiblemente se debió a una mayor afinidad por el antígeno por parte de los anticuerpos producidos en gallina en comparación con los producidos en conejo (Roitt, 2003), considerando que la concentración de antígeno (granulovirus del Perú) era la misma en los dos casos y entre mayor afinidad tenga el anticuerpo por el antígeno puede reconocer menores concentraciones de éste (Klimentzou *et al.*, 2006).

Esta mayor afinidad de los anticuerpos de gallina en comparación con los de conejo ha sido reportada por otros autores como Klimentzou y colaboradores

(2006), quienes produjeron anticuerpos policlonales tanto en gallina como en conejo contra un polipéptido de mamíferos asociado con la muerte celular y que cuenta con una baja inmunogenicidad y anticuerpos policlonales contra este mismo polipéptido asociado a una proteína que le confiere una mayor inmunogenicidad, esto con el fin de evaluar que sistema de producción era más eficiente. En dicho trabajo se encontró que los anticuerpos tipo IgY presentaron un título y una afinidad mayor por el antígeno en comparación con los anticuerpos tipo IgG, lo cual puede ser atribuido a diferencias en los epítopes del antígeno que son reconocidos por los linfocitos B tanto de la gallina como del conejo.

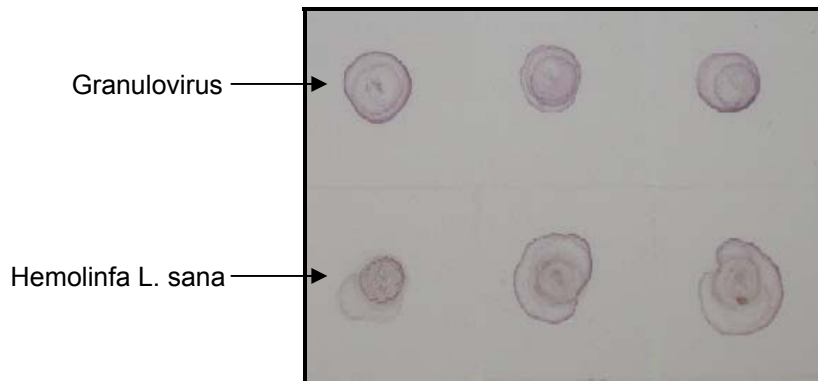


Figura 10. Dot blot de afinidad de las IgY por el antígeno

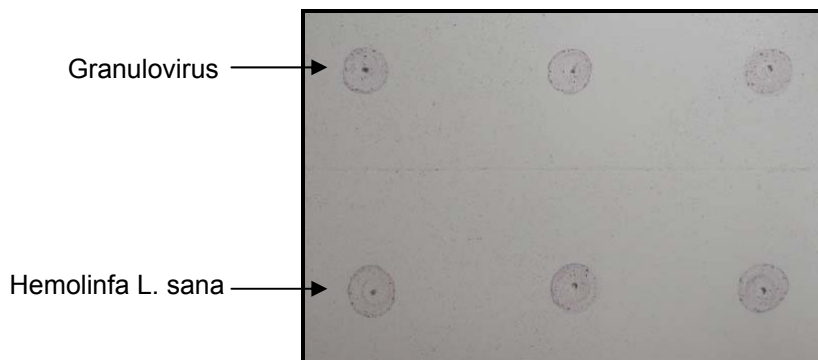


Figura 11. Dot blot de afinidad de las IgG por el antígeno

6.7 Reconocimiento de la proteína antigénica viral

Con miras a determinar las proteínas reconocidas por los anticuerpos producidos tanto a partir de gallina como de conejo se realizó una prueba de Western blot. Una vez realizada la electroforesis de tipo SDS-PAGE, la electrotransferencia a un papel de nitrocelulosa y el tratamiento con los diferentes anticuerpos, se pudo observar una mayor afinidad de los anticuerpos IgY e IgG a una proteína de aproximadamente 30 KDa que correspondería a la granulina que como se mencionó anteriormente es la proteína que se encuentra en mayor proporción en los granulovirus, comprobando así que la granulina posee propiedades antigénicas que permiten el desarrollo de una respuesta inmune (Fig. 12 y 13).

Los resultados obtenidos con esta técnica fueron satisfactorios, considerando que en algunos casos como lo reportan Klimentzou y colaboradores (2006), no se logra transferir la proteína de interés a la membrana de nitrocelulosa aunque se modifique la metodología, cambiando las condiciones de la electrotransferencia o la membrana utilizada, en el presente trabajo, las proteínas se transfirieron correctamente a la membrana para su posterior evaluación.

Sin embargo, tanto con las IgY como con las IgG se observaron otras bandas en la membrana que corresponden a proteínas de mayor peso molecular, es decir, que los anticuerpos muy posiblemente están reconociendo proteínas larvales ya que esta prueba se montó con el macerado de larvas infectadas con las diferentes cepas de granulovirus, tanto las cepas nativas como la del Perú y no con virus purificado. Este posible reconocimiento de proteínas larvales coincide con lo observado en el Dot blot ya que en esta prueba también hubo una reacción de los anticuerpos con el control negativo que correspondía a la hemolinfa de una larva sana.

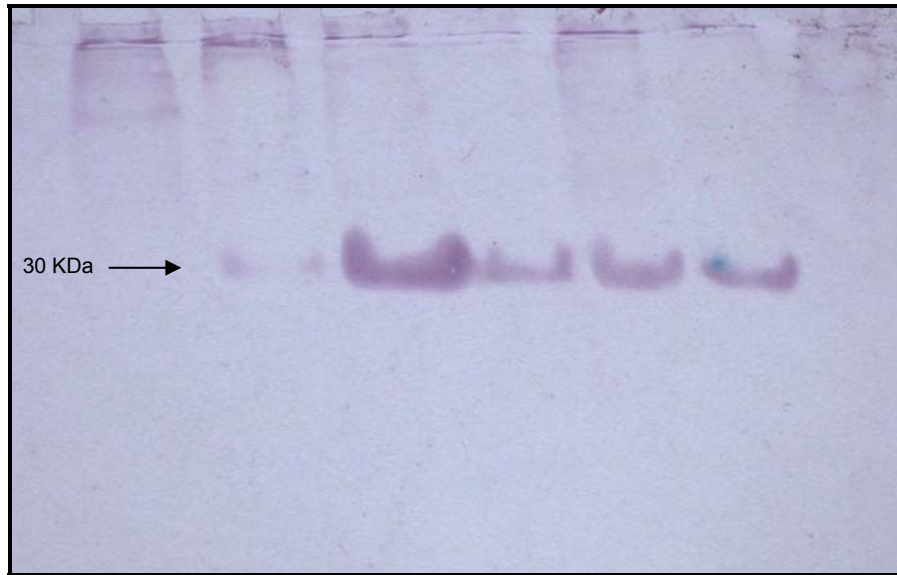


Figura 12. Membrana de nitrocelulosa de la prueba de Western blot para los anticuerpos obtenidos a partir de gallina.

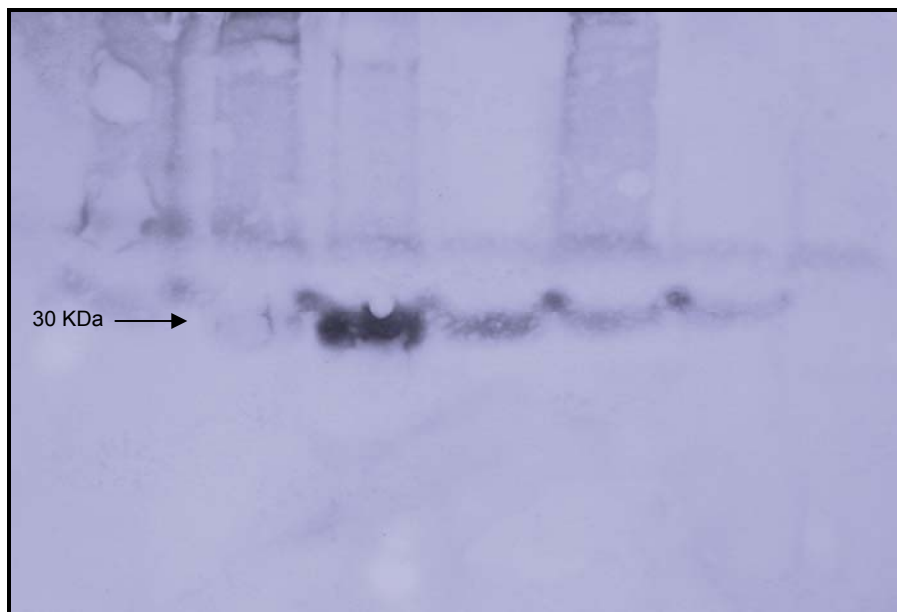


Figura 13. Membrana de nitrocelulosa de la prueba de Western blot para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo.

De igual forma, es posible que los anticuerpos estén reconociendo otras proteínas del virus diferentes a la granulina, ya que se trabajó con el virus completo y no con la granulina purificada. Según Caballero y colaboradores (2001), cuando la electroforesis se realiza a partir de viriones aparecen entre 15 y 25 bandas de polipéptidos de intensidad variable y pesos comprendidos entre 12 y 100 KDa, lo que indica que la partícula viral tiene varias proteínas para las cuales también podrían haberse generado anticuerpos de reconocimiento.

Los anticuerpos producidos contra el granulovirus del Perú reconocieron y se unieron efectivamente a este antígeno, sin embargo, también se unieron a los aislamientos nativos ya que en estos se observó la misma banda de aproximadamente 30 KDa, lo cual podría indicar la presencia de granulina en las suspensiones y por lo tanto, se podría sugerir que estos aislamientos provenientes de diferentes zonas productoras de papa en el país, corresponden efectivamente a granulovirus. Esto es posible puesto que en muchas ocasiones se producen anticuerpos contra un antígeno que es homólogo al antígeno de interés pero que no se puede aislar o purificar con facilidad (De *et al.*, 1999), o como en este caso que se buscaban anticuerpos que reconocieran una proteína en común, consiguiendo una reacción que facilita el trabajo con el antígeno problema.

En ocasiones los anticuerpos producidos contra un antígeno presentan reacciones inespecíficas al reconocer un antígeno diferente, como describieron Kniel y colaboradores (2004), quienes produjeron anticuerpos contra una proteína recombinante de 40 KDa (rCVP40) y al realizar una prueba de Western blot encontraron que estos anticuerpos no sólo reconocían la proteína recombinante sino también la proteína nativa de 40 KDa y además reaccionaban con otra proteína nativa de 30 KDa, la cual no

pudieron relacionar con el antígeno de 40 KDa con el cual se produjeron los anticuerpos.

Para obtener anticuerpos policlonales de mayor afinidad se podría trabajar únicamente con la granulina como antígeno, ya que ésta es la proteína que se encuentra en mayor proporción en los granulovirus y así se evitaría la producción de anticuerpos contra otras proteínas que generan inespecificidad. Además, la utilización de proteínas virales individuales como antígeno ha tomado gran importancia en la evaluación de la respuesta inmune en diferentes enfermedades e infecciones (Li *et al.*, 2006; Kniel *et al.*, 2004; Parola *et al.*, 2003; Kaba *et al.*, 2003; Iwanaga *et al.*, 2002; Abdelmagid *et al.*, 1998). Sin embargo, en algunos trabajos se ha logrado obtener anticuerpos policlonales utilizando como antígeno partículas virales completas, las cuales no generan reacciones inespecíficas. Tal es el caso de Nadala y Loh (2000), quienes inocularon en conejo un virus completo purificado para la producción de un antisuero con el fin detectar dicho virus en camarones sin presentarse reacciones inespecíficas ni falsos positivos.

Para poder definir si la presencia de estas bandas de pesos moleculares mayores es debida al reconocimiento de proteínas larvales o de proteínas virales diferentes a la granulina, es necesario montar una nueva prueba de Western blot en la que se incluya el macerado de una larva sana y virus puro para determinar si los anticuerpos reaccionan con estos y se producen nuevamente dichas bandas.

6.8 Titulación de anticuerpos mediante prueba de ELISA

Las concentraciones óptimas de trabajo tanto para el antígeno como para los anticuerpos se determinaron mediante pruebas de ELISA. Estas concentraciones se utilizarán para pruebas futuras con miras a reducir el desperdicio de material y evitando falsos negativos. Para definir cuales eran las concentraciones óptimas de antígeno para llevar a cabo el recubrimiento de la placa, se realizó la prueba de Criss-cross tanto para los anticuerpos producidos en gallina como para los producidos en conejo (Fig. 14 y 15). Esta prueba suele utilizarse para optimizar la utilización de reactivos biológicos como antígenos, anticuerpos y conjugados cuando se estandarizan pruebas de ELISA (Ruelas y Rosadio, 1999).

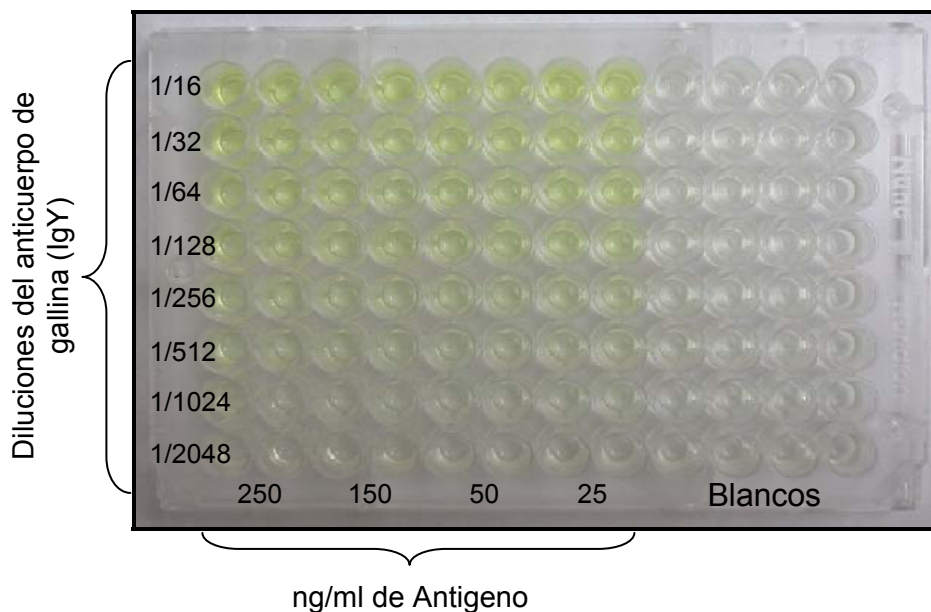


Figura 14. Criss-cross para los anticuerpos producidos en gallina

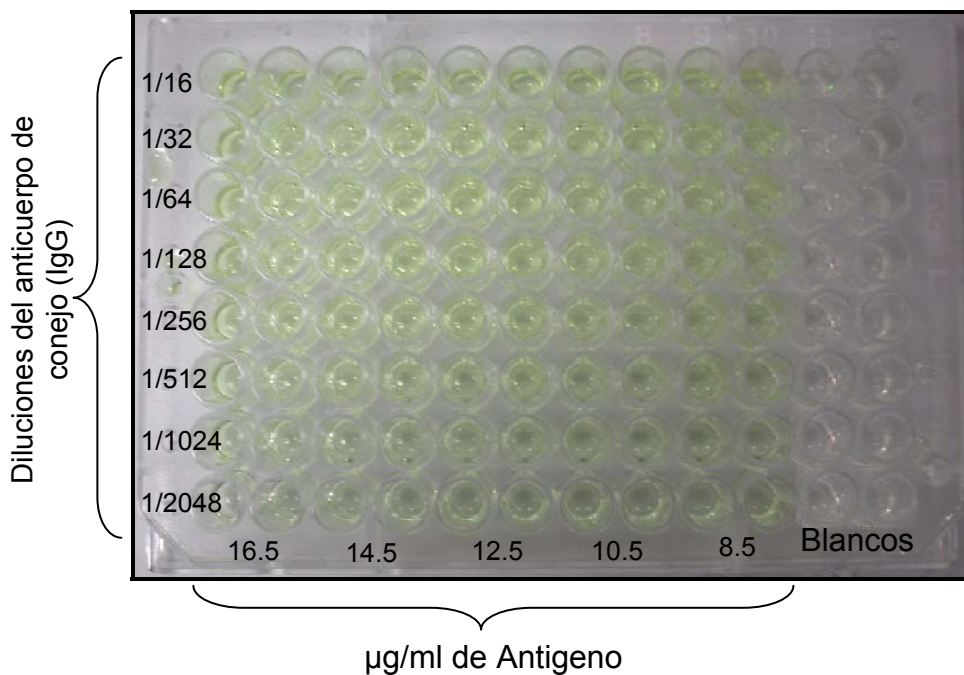


Figura 15. Criss-cross para los anticuerpos producidos en conejo

Las concentraciones de virus utilizadas en la prueba de Criss-cross para los anticuerpos producidos en gallina, desde 25 ng de virus por ml hasta 250 ng de virus por ml, fueron adecuadas para determinar la concentración óptima de recubrimiento de la placa, ya que con este rango se observó cómo los valores de absorbancia aumentaban proporcionalmente a la concentración de virus hasta lograr estabilizarse (Fig. 16), por lo tanto, no hubo necesidad de probar con otras concentraciones virales.

Al contrario de lo sucedido con los anticuerpos producidos en gallina, en el Criss-cross realizado con los anticuerpos producidos en conejo, con el primer rango de concentraciones utilizadas no se detectó reacción por parte de los anticuerpos al no observarse coloración amarilla (producida por el p-nitrofenilfosfato al escindir la enzima fosfatasa alcalina) al momento de adicionar la solución reveladora. Se probaron nuevas concentraciones para poder determinar la concentración óptima de recubrimiento para las IgG. El

valor adecuado de concentración se obtuvo cuando se usaron concentraciones desde 8.5 μg de virus por ml hasta 16.5 μg de virus por ml, rango a partir del cual los datos de absorbancia se estabilizaron (Fig. 17). Como se describió anteriormente, para poder determinar cual era la concentración de antígeno óptima (virus del Perú) para el recubrimiento de la placa, se relacionó la absorbancia de diferentes suspensiones de virus con la concentración en ng por ml o μg por ml dependiendo del anticuerpo con el que se trabajó (IgY o IgG). Una vez las absorbancias se mantuvieron constantes se pudo apreciar una zona de meseta a partir de la cual se seleccionó la concentración óptima de recubrimiento.

Este mismo procedimiento fue llevado a cabo por Ferriol y colaboradores (1999), quienes buscaban la concentración óptima de recubrimiento para la optimización de una prueba de ELISA de tipo indirecto. Dicha prueba se utilizaría para la cuantificación de anticuerpos isotipo IgG anti-proteínas de membrana externa del meningococo B en suero de individuos vacunados. En este trabajo se determinó que los valores de absorbancia aumentaban proporcionalmente a la concentración de recubrimiento hasta 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, concentración a partir de la cual se mantuvieron constantes y basados en estos resultados seleccionaron 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como concentración óptima de recubrimiento, para no tomar el dato límite de la meseta. Del Campo y colaboradores (2002), determinaron la concentración óptima de recubrimiento de un lipopolisacárido utilizado como antígeno en la estandarización de una prueba de ELISA mediante esta misma metodología y Klimentzou y colaboradores (2006) realizaron un procedimiento similar para titular IgYs e IgGs contra una proteína, al relacionar la concentración de los anticuerpos con la absorbancia a 405 nm.

En el caso de los anticuerpos producidos en gallina, las absorbancias más altas se observaron a partir de la concentración de 150 ng de virus por ml, se

decidió entonces utilizar 200 ng de virus por ml para la sensibilización de las placas para no tomar el punto que se encontraba en el límite de la meseta y garantizar así un recubrimiento óptimo (Fig. 16). Para los anticuerpos producidos en conejo, las absorbancias más altas se observaron a partir de la concentración de 12.5 μg de virus por ml y en este caso se decidió utilizar 13 μg de virus por ml para la sensibilización óptima de las placas (Fig. 17).

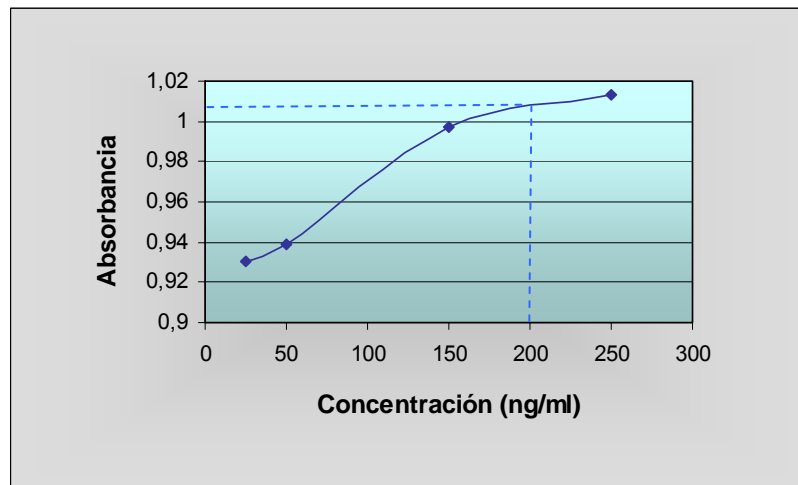


Figura 16. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para las IgYs

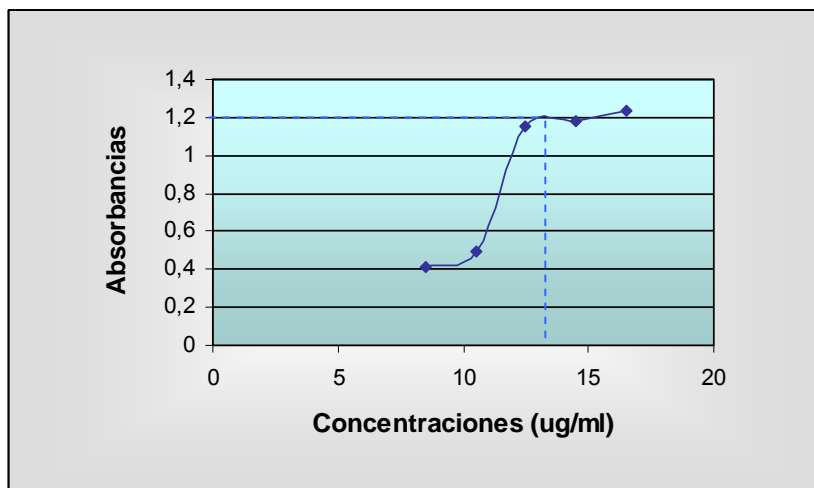


Figura 17. Determinación de la concentración óptima de recubrimiento para las IgGs

En un trabajo similar al presente, Parola y colaboradores (2003) evaluaron anticuerpos contra la granulina del granulovirus de *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) y encontraron una relación lineal entre los valores de absorbancia a 490 nm y el incremento en la cantidad de granulina, determinando que por encima de los 1.5 µg de granulina por ml los datos de absorbancia formaban una meseta. Al realizar una prueba de ELISA demostraron que los anticuerpos producidos detectaban 0.53 ng de granulina por ml, valor menor a lo encontrado en este trabajo. Los autores sugieren que este resultado es un avance importante ya que anteriormente otros investigadores reportaron los niveles de anticuerpo óptimos de recubrimiento entre 2.2 y 100 ng de granulina por ml. La concentración óptima de recubrimiento obtenida con los anticuerpos producidos en gallina se aproxima a este rango (200 ng/ml), además cabe decir que en los trabajos descritos anteriormente se trabajó con la granulina pura y en el presente estudio se utilizó el virus completo. Además, otros autores reportan concentraciones óptimas de antígeno cercanas a los 200 ng/ml, lo cual indica que la concentración óptima de recubrimiento lograda con las IgY en el presente trabajo se encuentra en el promedio de lo descrito por otros investigadores (Klimentzou *et al.*, 2006; Eamsobhana *et al.*, 2004; Abdelmagid *et al.*, 1998).

Al comparar los datos de concentración óptima obtenidos con los anticuerpos producidos en gallina y en conejo, se puede sugerir que las IgY son más afines al antígeno que las IgG, ya que reconocen concentraciones menores de virus, al reaccionar con 200 ng de virus por ml en comparación con las IgG que necesitan concentraciones por encima de 13 µg de virus por ml para dar una respuesta confiable y evitar falsos negativos.

Una vez se determinaron las concentraciones óptimas de antígeno para el recubrimiento de la placa, se realizó la prueba de ELISA de titulación para

determinar cual era la concentración óptima de trabajo tanto para las IgY como para las IgG (Fig. 18). Los valores de absorbancia obtenidos para cada dilución de anticuerpo se promediaron y las absorbancias obtenidas en el control negativo, los cuales consistieron en IgYs purificadas de un huevo de una gallina no inmunizada y suero de la sangre de un conejo no inmunizado, también se promediaron y a partir de estas absorbancias se halló el punto de corte que fue utilizado para determinar el título de cada anticuerpo con la fórmula (Parola *et al.*, 2003):

Punto de corte = promedio control negativo + 3 DS control negativo

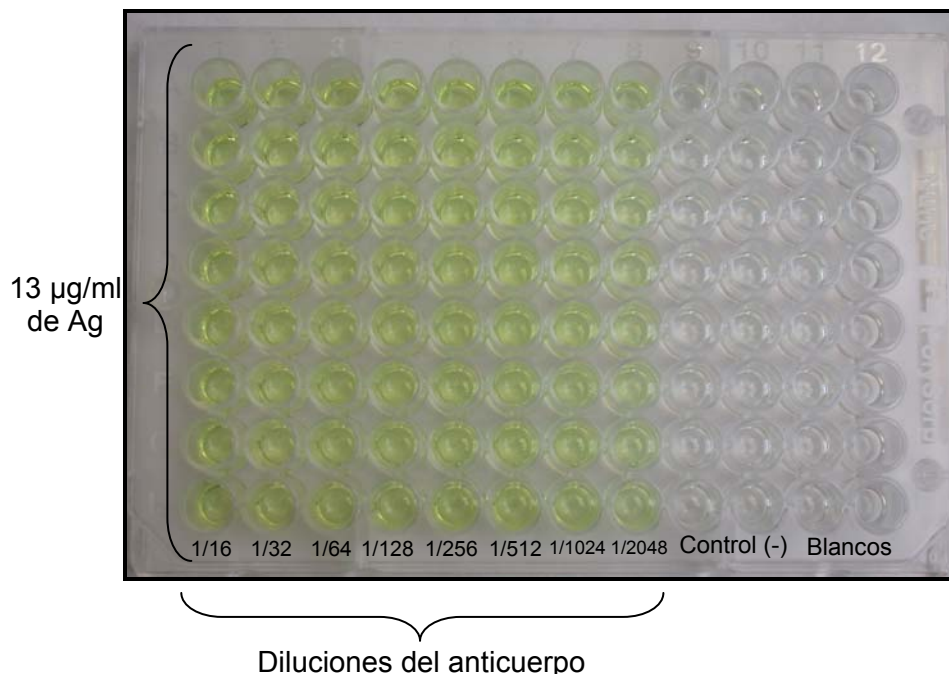


Figura 18. Titulación para los anticuerpos obtenidos a partir de conejo

Para los anticuerpos producidos en gallina se determinó el título de anticuerpos de un huevo puesto el día 15 post-inoculación y de un huevo puesto el día 30 post-inoculación para comparar la cantidad de anticuerpos producidos en el tiempo. El título encontrado fue de 1/128 tanto para las IgY

del día 15 como para las IgY del día 30 post-inoculación (Tabla 2), lo cual indica que a los 15 días pos-inoculación ya se presenta un título relativamente alto de anticuerpos que se mantiene después de 30 días de la última inoculación. Este es un título de anticuerpos adecuado según lo reportado por algunos autores que utilizan cantidades similares de anticuerpo como concentración óptima en el desarrollo de pruebas de ELISA (Eamsobhana *et al.*, 2004; Ruelas y Rosadio, 1999; Abdelmagid *et al.*, 1998).

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos en la titulación de IgYs anti-granulovirus del Perú

Día de postura	Diluciones del anticuerpo de gallina							
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
15	1,029	0,860	0,661	0,463	0,333	0,275	0,246	0,228
30	1,072	0,843	0,632	0,445	0,359	0,326	0,283	0,251

Punto de corte: **0.376**

En cuanto a los anticuerpos producidos en conejo, luego de realizar la prueba de ELISA se determinó que el título de IgGs anti-granulovirus era de 1/1024 (Tabla 3). Este es un título adecuado de anticuerpos considerando que algunos autores como Zeddani y colaboradores (1999), utilizan una dilución 1/1000 de anticuerpo primario para realizar una ELISA indirecta para la detección de un virus en muestras de larvas, título que resulta elevado en comparación con los valores comúnmente utilizados en estas pruebas (Eamsobhana *et al.*, 2004; Ruelas y Rosadio, 1999; Abdelmagid *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque los anticuerpos anti-granulovirus producidos en conejo presentan un título elevado, la afinidad que presentan por el antígeno no es la deseada, ya que para la detección del granulovirus necesitan

concentraciones por encima de 13 µg de virus por ml y para efectos prácticos se desearía que reconocieran concentraciones virales menores.

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos en la titulación de IgGs anti-granulovirus del Perú

Dilución del Anticuerpo	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Absorbancia a 405 nm	0,787	0,747	0,736	0,728	0,709	0,654	0,458	0,271

Punto de corte: **0.294**

6.9 Identificación de los aislamientos nativos

Una vez se hallaron las concentraciones óptimas de trabajo tanto de antígeno como de anticuerpo, se realizó una prueba de ELISA para determinar si los anticuerpos producidos contra el granulovirus del Perú reconocían los aislamientos nativos aislados de diferentes zonas productoras de papa en el país y para confirmar que estos correspondían a granulovirus.

Para esta prueba se trabajó únicamente con los anticuerpos producidos en gallina, ya que presentaron una mayor afinidad por el antígeno y su producción y purificación fueron menos dispendiosas en comparación con los anticuerpos producidos en conejo. Además, para los intereses del laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, estos son los anticuerpos más apropiados para trabajar, no sólo por ser los más fáciles de producir, sino porque al presentar mayor afinidad por el antígeno, permitirían realizar el control de calidad del producto formulado desarrollado y la identificación de nuevos aislamientos de una manera rápida, mediante una prueba de ELISA que permite detectar pequeñas concentraciones de virus en las muestras, sin necesidad de realizar otras pruebas más dispendiosas.

La prueba de ELISA confirmó que efectivamente los anticuerpos producidos en gallina contra el granulovirus del Perú reconocieron y se unieron a los aislamientos nativos (Fig. 19, columnas 1 a la 5), ya que se obtuvo una reacción positiva evidenciada por la producción de color amarillo y la lectura de las absorbancias (Anexo XII) que se encontraban por encima del punto de corte que se determinó anteriormente para hallar el título de anticuerpos, el cual corresponde a una absorbancia de 0.376 lo que determina la positividad de la prueba.

Las absorbancias leídas en las tres repeticiones de la prueba de ELISA muestran para el aislamiento VG001 un promedio de 1.263 cuyos datos se encuentran dispersos alrededor de 0.088, para los aislamientos VG002, VG003, VG004 y VG005 los promedios fueron en su orden: 1.283, 1.153, 1.061 y 1.340 cuyos datos se encuentran dispersos alrededor de 0.042, 0.075, 0.330 y 0.071, lo que demuestra que no hay gran variabilidad en los datos entre una repetición y otra (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos en la identificación de los aislamientos nativos mediante la prueba de ELISA

Muestra	VG005	VG002	VG001	VG004	VG003	Perú	NPV	L. cría	H. cría	L. campo	H. campo
Promedio (Abs)	1,340	1,283	1,263	1,061	1,153	1,149	1,051	0,861	0,937	0,695	0,948
Desviación estándar	0,071	0,042	0,088	0,330	0,075	0,081	0,043	0,067	0,032	0,058	0,114

Ya que los promedios de las absorbancias leídas para los diferentes aislamientos confirman el reconocimiento de éstos por parte de los anticuerpos producidos, este resultado sugiere que dichas muestras corresponden a granulovirus y que posiblemente los anticuerpos se unieron a

la granulina presente en las partículas virales. El reconocimiento de la granulina de un baculovirus con anticuerpos policlonales producidos utilizando otra cepa del virus, es posible debido a la alta homología de esta proteína entre aislamientos, ya que como se ha encontrado en varios estudios, los genes de la granulina de varios virus presentan en la secuencia de aminoácidos un 92% de similitud (Parola *et al.*, 2002). Además, en otros trabajos se ha encontrado que los anticuerpos producidos contra un virus en especial reconocen aislamientos de ese virus provenientes de otras zonas geográficas (Nadala y Loh, 2000).

La identificación de los aislamientos nativos como granulovirus es de gran importancia ya que CORPOICA ha venido produciendo un bioplaguicida para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, cuyo principio activo es un virus foráneo aislado de un hospedero distinto al que se desea controlar, por lo tanto, encontrar cepas nativas de granulovirus aisladas directamente del organismo blanco permitirá el desarrollo de un nuevo bioplaguicida con el cual se obtendrán muy posiblemente mejores resultados de eficiencia en el control de la plaga.

Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que los anticuerpos producidos también se unieron al nucleopoliedrovirus (Fig. 19, columna 7), esto posiblemente debido a que los anticuerpos se produjeron con el virus completo (aproximadamente 20 proteínas diferentes) y no con la granulina, proteína que no se presenta en los nucleopoliedrovirus, y considerando que tanto los granulovirus como los nucleopoliedrovirus comparten varias proteínas homólogas en la estructura del CI, éstas podrían haber sido reconocidas por los anticuerpos policlonales producidos (Caballero *et al.*, 2001). Al inmunizar los animales con el virus completo se produjeron anticuerpos policlonales que podrían reconocer otras proteínas virales aparte de la granulina, proteínas que también pueden estar presentes en el

nucleopoliedrovirus ya que en todos los baculovirus la estructura básica de la nucleocápsida es la misma. Dentro de las proteínas compartidas tanto en granulovirus como en nucleopoliedrovirus está el caso de una proteína denominada factor sinérgico de la infección viral (VEF), la cual fue clonada por primera vez en el granulovirus de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (TnGV), encontrándose más tarde genes homólogos en los granulovirus de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (HaGV) y *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) (PsunGV-H), así como en el nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) (LdMNPV) (Caballero *et al.*, 2001).

Purificar la granulina del granulovirus del Perú e inocularla a los animales para la producción de anticuerpos policlonales podría evitar que se presente esta reacción cruzada con los nucleopoliedrovirus. En estudios realizados previamente, al producir anticuerpos policlonales contra el granulovirus de *Epinotia aporema* inoculando la granulina pura en conejos, no se observó reacción alguna entre los anticuerpos y un nucleopoliedrovirus incluido en la evaluación, demostrando así que la purificación de la granulina genera anticuerpos más específicos (Parola *et al.*, 2003).

Los anticuerpos también reconocieron la hemolinfa y el macerado de larva sana provenientes de la cría, comportamiento similar al observado anteriormente en la prueba de Dot blot (Fig. 19, columnas 8 y 9). Para tener otro punto de comparación se recogieron larvas de campo que visiblemente no presentaban infección, pero estas también fueron reconocidas por los anticuerpos (Fig. 19, columnas 10 y 11). Como se mencionó anteriormente, esto podría deberse a que los anticuerpos probablemente reconocen proteínas larvales o a que las larvas presentan una infección latente con un granulovirus asintomático.

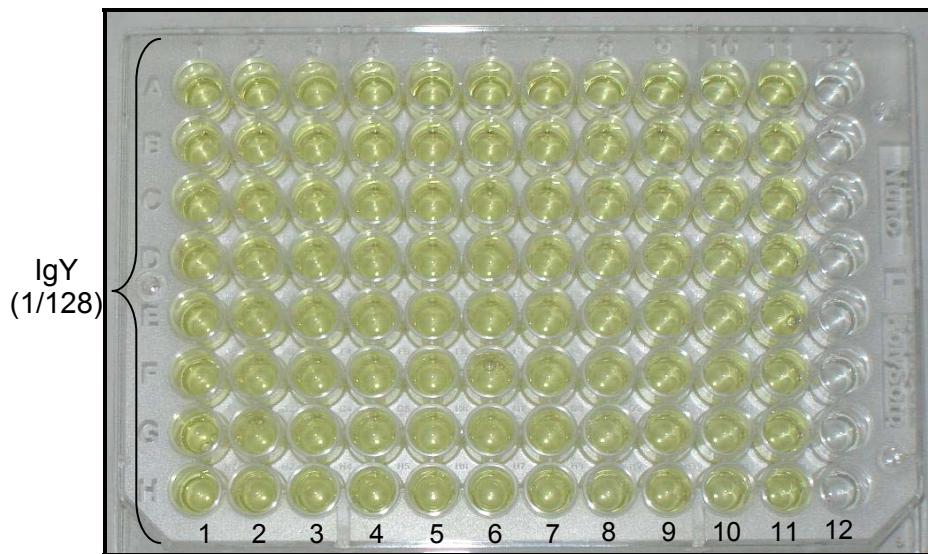


Figura 19. Identificación de los aislamientos nativos por una prueba de ELISA con anticuerpos producidos en gallina: 1) Aislamiento VG005. 2) Aislamiento VG002. 3) Aislamiento VG001. 4) Aislamiento VG004. 5) Aislamiento VG003. 6) Granulovirus del Perú. 7) Nucleopoliedrovirus. 8) y 9) Larva y hemolinfa de la cría, respectivamente. 10) y 11) Larva y hemolinfa de campo, respectivamente. 12) Blanco.

Las formulaciones a base de baculovirus son complejas y realizar recuentos de los cuerpos de inclusión en éstas es casi imposible por la complejidad que esto representa, por lo tanto, la utilización de pruebas de ELISA para realizar la titulación de los virus en los procesos de producción, así como procesos de identificación, es una alternativa promisoriosa como se ha demostrado en trabajos similares donde se ha obtenido una sensibilidad satisfactoria (Parola *et al.*, 2003; Zeddani *et al.*, 1999).

7. CONCLUSIONES

- Se seleccionó el sistema gallina para la producción de anticuerpos policlonales contra granulovirus por ser más eficiente y menos dispendioso para la obtención y purificación de los anticuerpos.
- Los anticuerpos policlonales producidos tanto en gallina como en conejo presentaron algunas reacciones inespecíficas.
- Se desarrolló una ELISA tipo sándwich para la identificación de granulovirus.
- Se confirmó la identidad de los aislamientos virales nativos como granulovirus, mediante la prueba de Western blot y el ELISA desarrollado.

8. RECOMENDACIONES

- Producir los anticuerpos policlonales en gallina utilizando como antígeno la granulina purificada.
- Realizar pruebas a las larvas de la cría para determinar la presencia de infecciones latentes por granulovirus.
- Utilizar la hemolinfa de las larvas para futuras pruebas de Dot blot con muestras de insecto y de esta forma evitar el manchado de las membranas de nitrocelulosa.
- Validar la prueba de ELISA desarrollada con los anticuerpos policlonales producidos con granulina purificada.
- Implementar la prueba de ELISA en el control de calidad del bioplaguicida a base de baculovirus.

9. REFERENCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. 2004. Inmunología celular y molecular. Quinta edición. Elsevier España, S. A. Madrid, España. 563 p.
- ABDELMAGID, O.; MANSOUR, M.; MINOCHA, H.; VAN DRUNEN, S. 1998. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. *Veterinary Microbiology*. 61: 249-259.
- AFANADOR, M.; BARCO, M. 2002. Purificación y caracterización de anticuerpos policlonales obtenidos en yema de huevo contra *Parvovirus canino*. Microbiólogos industriales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D. C., Colombia. 75 p.
- AGUILLON, J.; COLOMBO, A.; FERREIRA, A.; MOLINA, M.; SMITH, P. 1997. Anticuerpos policlonales antiinmunoglobulinas de salmón; herramientas potenciales para diagnóstico. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 29 (1): 133-139.
- AGINDOTAN, B.; THOTTAPPILLY, G.; UWAIFO, A.; WINTER, S. 2003. Production of monoclonal and polyclonal antibodies against a Nigeria isolate of banana streak virus. *African Journal of Biotechnology*. 2 (7): 171-178.
- ALARCÓN, C.; CASTELLANOS, J.; HURTADO, H. 2000. Anticuerpos aviares: alternativa en producción y diagnóstico. *Biomédica*. 20: 338-343.

- BEN-SALAH, H.; AALBU, R. 1992. Field use of granulosis virus to reduce initial storage infestation of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller), in North Africa. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 38: 119-126.
- BOLLAG, D. 1996. *Protein methods*. Ed Wiley-Liss. New York, Estados Unidos. 420 p.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem*. 72: 248-154.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control de plagas. Ed Phytoma. España. Pp. 15-161, 479-518.
- CARTER, J. 1984. Viruses of pest control agents. *Biotechnology and genetic engineering review*. 1: 375-419.
- CHANDRA, P. 1979. *Métodos de biología molecular: para bioquímicos, médicos, veterinarios y biólogos*. Ed Acribia. Zaragoza, España. Pp. 115-116.
- CHEN, Y. P.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; LYNN, D. 2005. Baculovirus-based expression of an insect viral protein in 12 different insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 41: 43-49.
- CHIOU, V. 2002. A naturally existing analog to mammalian antibodies offers an alternative with broad applications. *IVD Technology*. Abril.

- CHRISTIAN, P.; GIBB, N.; KASPRZAK, A.; RICHARDS, A. 2001. A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses (NPV *Baculoviridae*) isolated from the environment. *Journal of Virological Methods*. 96: 51-65.
- CIP, Centro internacional de la papa. 1992. Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus Phthorimaea*. Boletín de capacitación CIP-2. Lima, Perú. 19 p.
- COSSENTINE, J.; JENSEN, J.; EASTWELL, K. 2005. Incidence and transmission of a granulovirus in a large codling moth [*Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)] rearing facility. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90: 187-192.
- DE, B.; SAMPSON, J.; ADES, E.; JOHNSON, S.; STINSON, A.; CROOK, J.; THARPE, J.; HUEBNER, R.; CARLONE, G. 1999. Baculovirus expression, purification and evaluation of recombinant pneumococcal surface adhesion A of *Streptococcus pneumoniae*. *Pathobiology*. 67: 115-122.
- DEL CAMPO, J.; OCHOA, R.; LASTRE, M.; BRACHO, G.; TABEADA, C.; DÍAZ, M.; PÉREZ, O. 2002. Elisa cualitativo de IgA anti-lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* en saliva de humano. *VacciMonitor*. Año 11 (1): 5-10.
- DELGADO, A.; GONZÁLEZ, A. 2000. Evaluación de la prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 11 (2): 132-139.

- DOONAN, Shawn. 1996. Protein purification protocols. Methods in molecular biology. Volumen 59. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 480 p.
- EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; PUNTHUPRAPASA, P.; SUVOUTTHO, S. 2004. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnosis of human parastrongyliasis. Journal of Helminthology. 78: 287-291.
- ESPEJO, J.; BARRETO, A.; CARRASCAL, A.; CIFUENTES, C.; SOSA, A. 2004. Producción de la proteína recombinante humana Hsc70 y su aplicación en el desarrollo de un sistema de detección por ELISA. Universitas Scientiarum. 9: 69-80.
- ESPINEL, Carlos. 2005. Investigador del laboratorio de control biológico. CORPOICA. Tibaitatá.
- EVANS, O; O'REILLY, D. 1999. Expression and structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. Journal of General Virology. 80: 485-492.
- FERRIOL, X.; GARCÍA, A.; OCHOA, R.; BRAVO, I.; BLANCO, R.; ESTRADA, E.; NEREY, M.; MARTINEZ, J. 1999. Validación de una ELISA para la cuantificación de IgG humana antiproteína de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. Revista Cubana de Medicina Tropical. 51 (2): 99-105.
- GATICA, R.; SLEBE, J.; ULLOA, J.; YÁÑEZ, A. 2004. Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra

fructosa 1,6-bisfosfatasa en huevos de gallina. Archivos de medicina veterinaria. 36 (1): 49-58.

- GÓMEZ, J. 2005. Búsqueda y selección de aislamientos nativos de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en cultivos de papa de Cundinamarca. Microbióloga industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D. C., Colombia. 139 p.
- GONZÁLEZ, A.; BATISTA, N.; GONZÁLEZ, M.; INFANTE, J.; ORTÍZ, M.; TORRES, V. 2002. Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. VacciMonitor. 3: 6-9.
- HAAK-FRENDSCHO, M. 1994. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. Promega Notes Magazine. 46: 11-14.
- HALLIWELL, R.; GORMAN, N. 1992. Inmunología clínica veterinaria. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 560 p.
- HARLOW, D. 1988. Antibodies, laboratory manual. Ed CSH. Estados Unidos. Pp. 283-317.
- HERNIOU, E.; OLSZEWSKI, J.; CORY, J.; O'REILLY, D. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. Annual Review of Entomology. 48: 211-234.
- HUGHES, D.; POSSEE, R.; KING, L. 1994. Quantification of latent *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects

using a PCR-scintillation proximity assay. *Journal of Virological Methods*. 50: 21-28.

- IJKEL, W.; GOLDBACH, R.; ROODE, E.; VLAK, J.; ZUIDEMA, D. 2002. Characterization of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus ORF 17/18, a homologue of *Xestia c-nigrum* granulovirus ORF 129. *Journal of General Virology*. 83: 2857-2867.
- IWANAGA, M.; KURIHARA, M.; KOBAYASHI, M.; KANG, W. 2002. Characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *orf68* gene that encodes a novel structural protein of budded virus. *Virology*. 297: 39-47.
- JANEWAY, C. 1993. Reconocimiento inmunitario de cuerpos extraños. *Investigación y Ciencia*. Noviembre. Pp. 26-33.
- KABA, S.; HEMMES, J.; VAN LENT, J.; VLAK, J.; NENE, V.; MUSOKE, A.; VAN OERS, M. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria parva* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Engineering*. 16 (1): 73-78.
- KLIMENTZOU, P.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; ZIKOS, C.; BECK, A.; SKOPELITI, M.; CZARNECKI, J.; TSITSILONIS, O.; VOELTER, W.; LIVANIOU, E.; EVANGELATOS, G. 2006. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides*. 27: 183-193.
- KNIEL, K. E.; HIGGINS, J.; TROUT, J.; FAYER, R.; JENKINS, M. 2004. Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum*

virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts. *Journal of Microbiological Methods*. 58: 189-195.

- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 681–685.
- LI, Z.; PAN, L.; YU, H.; LI, L.; GONG, Y.; YANG, K.; PANG, Y. 2006. Characterization of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus 38.7k protein, which contains a conserved BRO domain. *Virus Research*. 115: 185-191.
- LUQUE, T.; FRINCH, R.; CROOK, N.; O'REILLY, D.; WINSTANLEY, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology*. 82: 2531-2547.
- LLAMES, L.; GOYACHE, J.; DOMENECH, A.; DE AVILA, A.; SUAREZ, G.; GOMEZ, E. 1999. Rapad detection of specific polyclonal and monoclonal antibodies against bovine leukemia virus. *Journal of Virological Methods*. 82: 129-136.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1096 p.
- MARKOVIC, I.; CHERNOMORDIK, L.; PULYAEVA, H.; SOKOLOFF, A. 1998. Membrane fusion mediated by Baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *The Journal of Cell Biology*. 143 (5): 1155-1166.

- MATHEWS, C.; HOLDE, K.; AHERN, K. 2004. Bioquímica. Tercera edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1335 p.
- MARTINEZ, C. 1998. Estadística y muestreo. Editorial ecoe ediciones. Bogotá, Colombia. Pp. 524-538.
- MERLÍN, J.; ARCE, A.; GONZÁLEZ, J.; GUERREIRO, A.; VILLAESCUSA, R. 2001. Preparación de un conjugado peroxidasa-anti IgG humana (cadena γ) en conejo. Revista Cubana de Hematología e Inmunología y Hemoterapia. 17 (2): 132-137.
- MOTOI, Y.; HATTA, H.; INOUE, S.; MORIMOTO, K.; SATO, K.; YAMADA, A. 2005. Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. Japanese Journal of Infectious Diseases. 58: 115-118.
- NADALA, E.; LOH, P. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp. Journal of Virological Methods. 84: 175-179.
- NODEN, D. 1990. Embriología de los animales domésticos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 399 p.
- OKANO, K.; MAEDA, S.; MIKHAILOV, V. 1999. Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DPB and LEF-3, to viral replication factories. Journal of Virology. 73 (1): 110-119.
- OUTERIDGE, P. M. 1989. Inmunología veterinaria. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 273 p.

- PAROLA, A.; GLIKMAN, G.; ROMANOWSKI, V.; SCIOCCO-CAP, A. 2003. An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). *Journal of Virological Methods*. 112: 13-21.
- PAROLA, A.; MANZÁN, M.; LOZANO, M.; GHIRINGHELLI, M.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. 2002. Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes*. 25: 327-339.
- PEARSON, M.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G. 2000. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the *Baculoviridae*. *Journal of Virology*. 74 (3): 6126-6131.
- PINTO, J. 2001. Obtención de anticuerpos policlonales en huevos de gallina dirigidos contra *Parvovirus canino*. *Microbióloga industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D. C., Colombia. 92 p.
- POH-SING, N.; SUSUMU, I.; TOYOKO, H.; MAYUKO, O.; TOSHIO, N.; TETSUYA, K.; YOSHIHIKO, F. 2003. Production of inhibitory polyclonal antibodies against cytochrome P450s. *Drug Metab. Pharmacokin*. 18 (3): 163-172.
- ROITT, I. 2003. *Inmunología: fundamentos*. Décima edición. Ed. Medica panamericana. Argentina. 520 p.

- RUELAS, D.; ROSADIO, R. 1999. Desarrollo y estandarización de una prueba de ELISA indirecta para brucelosis ovina. Revista de investigaciones veterinarias del Perú. 10 (2): 43-55.
- SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMAN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. 1996. The production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. ATLA. 24: 925-934.
- SCIOCCO-CAP, A.; PAROLA, A.; GOLDBERG, A.; GHIRINGHELLI, P.; ROMANOWSKI, V. 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* wals (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. Applied and Environmental Microbiology. 67 (8): 3702-3706.
- SERAYLÁN, S.; VARGAS, L. 1999. Purificación y control de calidad de la fracción antigénica F1 de *Yersinia pestis*. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 16 (1-2): 48-50.
- SUDEEP, A.; MISHRA, A. C.; MOURYA, D. T. 2005 a. Insect cell culture in research: Indian scenario. Indian Journal of Medical Research. 121 (6): 725-738.
- SUDEEP, A.; ATHAWALE, S. S.; KHUSHIRAMANI, R.; MISHRA, A. C.; MOURYA, D. T. 2005 b. Characterization of a newly established potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) cell line. Indian Journal of Medical Research. 121: 159-163.
- TIZARD, I. 2002. Inmunología veterinaria. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 517 p.

- VILLAMIZAR, L.; TORRES, L.; ESPINEL, C.; GRIJALBA, E.; GÓMEZ, J.; COTES, A. 2006. Reconocimiento de aislamientos nativos de virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Revista Sociedad Colombiana de Entomología. Socolen. (En prensa).
- WARR, G.; HIGGINS, D.; MAGOR, K. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunology Today. 16 (8): 392-398.
- ZEDDAM, J.; HARIS, T.; LÓPEZ, M.; MANGOENDIHARJO, S.; POLLET, A. 1999. Occurrence and virulence of a granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. Journal of Invertebrate Pathology. 74: 48-54.

10. ANEXOS

ANEXO I. Comunicación personal

En el laboratorio de Control Biológico de CORPOICA Tibaitatá se ha venido trabajando en el desarrollo de un bioplaguicida a base de granulovirus para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*. Sin embargo, al ser la cepa de granulovirus foránea, se llevó a cabo la búsqueda y colección de aislamientos nativos de virus de la granulosis a partir de larvas de *Tecia solanivora*, teniendo dentro de las actividades de este proyecto la implementación de una metodología para la purificación del virus con miras a realizar pruebas de identificación y patogenicidad.

Julio de 2005

CARLOS ESPINEL
Investigador Laboratorio de Control Biológico
CORPOICA-Tibaitatá
Tel: 4227300 ext. 1409

ANEXO II. Reactivo de Bradford

Azul de coomassie	0.02 g
Etanol 96%	10.4 ml
Ácido fosfórico 80%	31 ml
Agua destilada	250 ml

ANEXO III. Reactivos para el Dot blot y el Western blot

1. Tampón de transferencia

Tris HCl 24.8 mM (pH 8.3)	3 g
Glicina 192 mM	14.4 g
Metanol 10% (v/v)	100 ml
Completar a un litro con agua destilada.	

2. Tampón de bloqueo

Leche descremada	50 g
Tris HCl 1 M	100 ml
EDTA 0.2%	2 ml
Tween 20	1 ml
NaCl	9 g
Agua destilada	897 ml

3. Tampón de lavado

Tris HCl 1 M	200 ml
EDTA 0.2%	4 ml

Tween 20	2 ml
NaCl	18 g
Agua destilada	1794 ml

ANEXO IV. Reactivos para la prueba de ELISA

1. Tampón de lavado

PBS	400 ml
Tween 20	0.2 ml

2. Tampón de bloqueo

PBS	50 ml
Leche descremada	2.5 g
Tween 20	25 µl

3. Solución reveladora

Para revelar las placas de ELISA se prepara un buffer dietanolamina al cual se le adiciona el sustrato cromógeno que toma un color amarillo cuando la prueba es positiva. El buffer dietanolamina se prepara de la siguiente forma: se toman 48.5 ml de dietanolamina, se adicionan a 500 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 9.8 con HCl (37%).

Para preparar la solución reveladora se adiciona 1 tableta de p-nitrofenilfosfato (20 mg) en 20 ml de buffer dietanolamina y se adicionan 200 µl de MgCl₂ 0.5 M.

ANEXO V. Datos de concentración y sus correspondientes absorbancias obtenidos en la prueba de Bradford

CONCENTRACIÓN DE BSA µg/ml	20	30	40	60	80
ABSORBANCIAS	0,257	0,53	0,6	0,801	1,095
	0,245	0,535	0,608	0,842	1,143
	0,277	0,516	0,577	0,788	1,192
	0,225	0,532	0,62	0,799	1,102
	0,281	0,525	0,611	0,832	1,134
	0,272	0,535	0,607	0,835	1,117
	0,264	0,537	0,598	0,819	1,102
	0,278	0,548	0,593	0,794	1,150
	0,284	0,535	0,579	0,821	1,148
	0,272	0,544	0,59	0,832	1,127

ANEXO VI. Análisis estadístico de la curva de calibración de Bradford

STATISTIX FOR WINDOWS

Unweighted Least Squares Linear Regression Of Absorbanc

PREDICTOR

VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P
CONSTANT	0.02712	0.01137	2.38	0.0204
CONCENTRA	0.01384	2.452E-04	56.42	0.0000

R-SQUARED **0.9821** RESID. MEAN SQUARE (MSE) 0.00246
 ADJUSTED R-SQUARED 0.9818 STANDARD DEVIATION 0.04956

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
REGRESSION	1	7.81600	7.81600	3182.67	0.0000
RESIDUAL	58	0.14244	0.00246		
TOTAL	59	7.95844			

CASES INCLUDED 60 MISSING CASES 0

ANEXO VII. Datos promediados de las tres lecturas de la prueba de Elisa para la identificación de los aislamientos nativos

VG005	VG002	VG001	VG004	VG003	Perú	NPV	L. cría	H. cría	L. campo	H. campo	Blanco
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1,416	1,442	1,568	1,270	1,341	1,293	1,171	1,017	1,046	0,808	1,141	0,127
1,488	1,412	1,405	1,374	1,344	1,337	1,240	1,044	1,090	0,821	1,091	0,149
1,470	1,426	1,305	1,248	1,341	1,339	1,090	1,031	1,059	0,829	1,085	0,088
1,375	1,318	1,325	1,305	1,195	1,270	1,157	0,932	1,055	0,844	1,021	0,108
1,400	1,421	1,330	0,363	1,198	1,292	1,125	0,960	1,032	0,770	1,264	0,102
1,416	1,376	1,296	1,265	1,249	1,251	1,154	1,007	1,061	0,886	0,903	0,107
1,988	1,383	1,362	1,198	1,154	1,172	1,173	0,861	0,977	0,694	0,968	0,097
1,418	1,354	1,381	1,328	1,269	1,107	1,162	0,900	1,043	0,772	0,976	0,088