Evaluación epidemiológica molecular de las cepas circulantes del virus de la enfermedad de Marek en brotes presentados en Colombia durante el período de 2000 al 2012

Pablo Andrés Lopera Toro

Director:
Juan Carlos Rodríguez Lecompte
DVM MSc PhD

Doctorado en Ciencias Animales
Universidad de Antioquia
2017

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

Agradecimientos

A mi familia, quienes me han demostrado que día a día se debe trabajar por los ideales, quienes han estado conmigo en todos los momentos apoyándome y retándome para qué sea mejor ser humano, gracias por resistir los excesivos momentos de dedicación y poco tiempo para con ellos, gracias por ser los motores para estar cada día más agradecido por ser su hijo y hermano.

A mi maestro Juan Carlos Rodríguez Lecompte (hoy no es Dr.) gracias por sus enseñanzas de vida, por mostrarme el camino a seguir académicamente y principalmente por hacerme un mejor ser humano, gracias por ser mi amigo, más que mi supervisor, gracias por las oportunidades que me brindó para crecer, por demostrarme que todo tiene un poco más, que hay que pensar y hacer realidad mis sueños.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

Tabla de contenido

Agradecimientos……2

Lista de Figuras y Tablas……5

1. Información General ……..7
2. Resumen de la propuesta ……8
3. Marco teórico……..9
4. Objetivos……25
   - 4.1. Objetivo General……25
   - 4.2. Objetivos específicos……25
5. Capítulo 1: Marek Disease Virus: molecular approach to the virus and host immune response……26
   - 5.1. Introducción……31
   - 5.2. Herpesvirus……31
   - 5.3. Virus de la Enfermedad de Marek y clasificación patotípica……..32
   - 5.4. Características genómicas y proteómicas del virus de la enfermedad de Marek……..33
   - 5.5. Patogénesis de la Enfermedad de Marek……..36
   - 5.6. Signos clínicos de la Enfermedad de Marek……37
   - 5.7. Vacunación contra el virus de la Enfermedad de Marek ……39
   - 5.8. Respuesta inmune frente a la infección por el VEM……39
   - 5.9. Genes asociados con la susceptibilidad y resistencia a la enfermedad……...42
   - 5.10. Conclusión……45
6. Capítulo 2: Evaluación de la fosfoproteína pp38 y meq en tejidos infectados por el virus de la enfermedad de Marek por Inmunohistoquímica……47
   - 6.1. Introducción a la Inmunohistoquímica ……..……47
   - 6.2. Materiales y métodos……51
     - 6.2.1. Muestras……51

6.2.2. Histopatología……..51
6.2.3. Anticuerpos monoclonales……51
6.2.4. Inmunohistoquímica……52
6.3. Resultados……..54
6.4. Discusión……57
6.5. Conclusiones……..61
7. Capítulo 3: Determinación por medio de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa, de la presencia de la fosfoproteína pp38 y la proteína meq en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina ……..……..62
7.1. Introducción Reacción en cadena de la polimerasa……62
7.2. Materiales y métodos……65
7.2.1. Extracción de DNA……..65
7.2.2. Primers o Iniciadores ..……..66
7.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa……67
7.2.4. Visualización de los productos de la PCR……...67
7.2.5. Análisis de resultados……68
7.3. Resultados……..68
7.4. Discusión……76
7.5. Conclusiones……..79
8. Referencias……81

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

Lista de figuras y tablas

Figura 1. Secuencias de eventos celulares y virales durante la infección del virus de la Enfermedad de Marek……38

Figura 2: Genes virales asociados al desarrollo de linfomas y a evasión de la respuesta inmune contra el virus……44

Figura 3: Tinción con anticuerpos para pp38 en Timo de pollo de engorde infectado con el virus de la enfermedad de Marek en Santander – Colombia en 2008……...54

Figura 4: Distribución geográfica de las muestras positivas por IHC para el virus de la enfermedad de Marek en Colombia entre 2002 y 2012……56

Figura 5: Tinción con anticuerpos para pp38 en Hígado de gallina ponedora infectada con el virus de la enfermedad de Marek en Cundinamarca – Colombia en 2004……56

Figura 6: Distribución geográfica de las muestras positivas por PCR para el virus de la enfermedad de Marek en Colombia entre 2002 y 2012……68

Figura 7: Amplificación del gen HVT de 62 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la segunda columna se demuestra el control positivo, en las columnas 3, 4 y 8 la amplificación del gen en muestras positivas al virus de la enfermedad de Marek……..……70

Figura 8: Amplificación del gen VEM, 225 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la columna 8 se demuestra el control positivo, en las

columnas 2, 3 y 4 la amplificación del gen en muestras positivas al virus de la enfermedad de Marek……71

Figura 9: Amplificación del gen pp38, se observa una banda de 1006 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la columna 8 la amplificación del gen en muestra positiva al virus de la enfermedad de Marek……72

Tabla 1: Resultados de la prueba de inmunohistoquímica para pp38 según el año, órgano, tipo de ave de corral y grado de expresión de pp38…..……55

Tabla 2: Primers usados para determinar la presencia de los genes pp38, región no codificante de HVT y meq ……66

Tabla 3: Resultados de la PCR para los genes VEM, pp38, Meq y Herpesvirus de Pavo (HVT) por año, el porcentaje de positividad es tomado sobre el total de las aves positivas a la prueba reliazada……69

Tabla 4: Correlación entre la presencia de los diferentes genes amplificados por PCR y su presencia en los órganos estudiados……73

Tabla 5: Cantidad de muestra con presencia de los genes pp38, MDV, HVT y positivas a pp38 por inmunohistoquímica según el tipo de órgano y la zona donde se presentaron los signos clínicos……74

Tabla 6: Cantidad de muestras con presencia de los genes pp38, MDV, HVT y positivas a pp38 por inmunohistoquímica según la especie afectada y el año en el cual se presentaron los signos clínicos……75

1. Información General

Título: Evaluación epidemiológica molecular de las cepas circulantes del virus de la enfermedad de Marek en brotes presentados en Colombia durante el período de 2000 al 2012

Estudiante: Pablo Andrés Lopera Toro
Identificación: C.C. 15443011
Autor: Pablo A Lopera.
E-mail: pabloandreslopera@gmail.com

Programa de estudios: Doctorado en Ciencias Animales

Nombre del Director y miembros del Comité Tutorial:
Director del comité tutorial (tutor): Juan Carlos Rodriguez Lecompte DMV, MSc, PhD
Miembro del comité tutorial: Juan Esteban Pérez Montes MV, MSc
Miembro del comité tutorial: Alejandro Ceballos Márquez DMV, MSc, PhD

2. Resumen de la propuesta

La enfermedad de Marek (EM) es una enfermedad linfoproliferativa de las aves de corral con distribución mundial, es inducida por un Alfaherpesvirus que establece latencia en linfocitos T, incluye un oncogén en su genoma y puede inducir linfomas (55). La enfermedad se puede presentar de diferentes maneras en las aves, como son: cutánea, visceral (tumores linfoides), nerviosa y ocular. Según la legislación agropecuaria nacional vigente es obligatoria la vacunación contra el virus de la enfermedad de Marek (VEM) en aves de un día de nacidas. Actualmente se ha determinado que el virus de la enfermedad de Marek ha evolucionado a patotipos más virulentos: medio (M), virulento (v), muy virulento (vv) y muy virulento + (vv+), dicha evolución se ha descrito que ha ocurrido en lapsos aproximados de 10 años para pasar de un patotipo a otro.

Desde 1973 es obligatoria la vacunación contra el virus de la enfermedad de Marek según la resolución ICA 00587. Los casos que se han presentado durante el periodo entre los años 2000 y 2012 compatibles con la EM han sido diagnosticados por el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA y reportados a la OIE, dado ese diagnóstico, no se conocen ¿Cuáles son los serotipos del virus de la enfermedad de Marek en dichos brotes?, así como ¿cuál ha sido la evolución de las cepas circulantes?. Por lo anterior los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar la presencia del genoma del VEM mediante técnicas moleculares y determinar los serotipos circulantes; y 2) Determinar por medio de inmunohistoquímica la presencia del virus en los tejidos empleados para el diagnóstico por histopatología.

Este será el primer estudio de este tipo en Colombia y sus resultados permitirán generar conocimiento acerca del agente causal en la zona de estudio y la capacidad que ha tenido este virus para cambiar y presentar enfermedad en las aves vacunadas.

3. Marco teórico

La enfermedad linfoproliferativa más común de las aves de corral es la EM, la cual es caracterizada por una infiltración mononuclear en nervios periféricos, gónadas, iris, hígado, bazo, músculo y piel. Esta enfermedad existe en todos los países del mundo, en algunos tiene más presencia que en otros ya que puede llegar a causar brotes agudos llevando como resultado una alta cantidad de decomisos en plantas de beneficio de aves, en el caso de ponedoras y reproductoras las mortalidades causadas por la enfermedad son altas resultando en bajas de producción (17).

La EM es causada por un Herpesvirus perteneciente a la subfamilia Alfaherpesvirinae, el VEM tiene 3 serotipos los cuales son caracterizados por sus propiedades oncogénicas, el serotipo 1 es oncogénico y el serotipo 2 y serotipo 3 (también llamado herpesvirus de pavo – HVT) son no oncogénicos (2). El VEM es un virus desnudo, hexagonal, posee una doble cadena de DNA linear con un tamaño variable entre 166 – 184 Kb según el serotipo, su organización genómica consiste en una región única larga y una región única corta cada una rodeada por regiones invertidas repetidas (regiones terminales repetidas e internas repetidas) (17, 71, 54).

El VEM posee entre 98 y 103 genes específicos o regiones asociadas con oncogenicidad, tres genes están siendo relacionados con esta propiedad todos ellos del serotipo 1; ellos son gen fosfoproteína pp38, meq (mayor determinante de virulencia) y una región de 132 pares de bases repetidas flanqueando la región invertida repetida; otros genes pueden codificar glicoproteínas asociadas con actividad inmunogénica del virus, estas son glicoproteína C (gC), gB, gD, gE, gH, gI, gK y gL (17, 52)

Muchos otros genes han sido identificados y tienen funciones homólogas a las que tienen en otros herpesvirus, genes que codifican enzimas involucradas en la replicación

viral (gen de la timidina quinasa, ribonucleótido reductasa y DNA polimerasa), genes que codifican las proteínas tegumentarias (UL49, UL48, UL47 y UL46), genes que codifican proteínas inmediatamente tempranas como ICP4 e ICP27, genes antisentido ICP47 asociados a la latencia del virus, SORF1, SORF2 y SORF3 asociados a la replicación (17, 2, 26).

Las gallinas y pollos son el hospedero natural más importante para el VEM, el contacto directo o indirecto con aves afectadas puede generar riesgo de infección ya que el virus puede diseminarse por vía aérea a través de la descamación de la piel y se replica en las capas epiteliales queratinizadas del folículo plumoso (29). Bajo condiciones de campo el virus puede sobrevivir durante meses en las plumas o la descamación de la piel de las aves a temperaturas entre 20 y 25ºC. El período de incubación del virus puede variar desde las 2 y 5 semanas, teniendo una fase de infección citolítica a los 3 y 6 días post-infección (dpi), luego sigue la fase de lesiones degenerativas en órganos linfoides a los 6 y 8 dpi, la infección mononuclear en nervios y otros órganos puede encontrarse a las 2 semanas post-infección (spi), las lesiones macroscópicas y los signos clínicos aparecen entre la 3 y 4 dpi (17; 72).

Los signos clínicos asociados a la EM están representados por una paresia progresiva asimétrica seguida de una parálisis completa de una o más extremidades, dependiendo de los nervios periféricos afectados se pueden observar las alas caídas, el cuello del animal afectado, el buche y el proventrículo se pueden observar dilatados, las aves pueden verse deprimidas, deshidratadas, emaciadas y algunas pueden estar en coma; puede también encontrarse problemas visuales por afectación del iris (77).

Los cambios macroscópicos en los órganos afectados por el VEM se denotan por un engrosamiento de nervios periféricos, principalmente del plexo celíaco y el vago cervical, estos nervios presentan pérdida de las estrías, decoloración gris o amarilla y

apariencia edematosa; los tumores linfoides pueden aparecer en varios órganos (gónadas, pulmones, corazón, mesenterio, riñón, hígado, bazo, Bolsa, timo, glándula adrenal, páncreas, proventrículo, intestino, iris, músculo esquelético y piel), los órganos se observan aumentados de tamaño (con excepción de la Bolsa), con decoloración difusa, algunos órganos presentan nódulos que se extienden por el parénquima del órgano (79).

Las lesiones no neoplásicas incluyen atrofia severa de la Bolsa y el Timo, lesiones degenerativas en médula ósea y varios órganos viscerales. Dentro de los cambios histopatológicos, en nervios periféricos se puede observar proliferación de células linfoblásticas, desmielinización y proliferación de células de Schwann, otra de las lesiones que se presenta en nervios es la infiltración difusa ligera a moderada de pequeños linfocitos y células plasmáticas, usualmente con edema, las lesiones linfomatosas en los órganos viscerales son similares a las encontradas en los nervios con proliferación de linfocitos de tamaño pequeño y medio, linfoblastos y reticulocitos primitivos activados (17; OIE, 2008 Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres).

Se han descrito los siguientes eventos secuenciales en la actividad patogénica del VEM en el hospedero, siendo descritas cuatro fases de la infección: 1) Infección temprana productiva y restrictiva causando cambios degenerativos, 2) infección latente, 3) segunda fase de la infección citolítica, infección productiva-restrictiva con inmunosupresión permanente y 4) fase proliferativa que involucra células linfoides infectadas no-productivas que pueden o no progresar a formación de linfomas (80).

El virus penetra por vía respiratoria donde es transportado por macrófagos hacia la bolsa de Fabricio, timo y bazo, las células blanco primarias son los linfocitos B y luego son infectados los linfocitos T activados. Entre los 7 y 8 dias post infección el virus se

puede encontrar en estado de latencia, principalmente en linfocitos T activados, la latencia puede presentarse durante un tiempo indefinido en las aves, en la fase donde se presentan las lesiones linfomatosas, estos tumores son una mezcla de células neoplásicas, inflamatorias y células inmunológicamente activas, las células blanco más comunes son las CD4+, CD8+ y CD4-/CD8- (17, 2).

Existen varios tipos de vacunas y de cepas de virus que se han utilizado para la inmunización de las aves contra el VEM; la cepa HVT (Del Inglés Herpes Virus of Turkeys) es una cepa no oncogénica que está siendo ampliamente utilizada para la vacunación de gallinas ponedoras y pollo de engorde y se utiliza combinada con otras cepas para inmunizar gallinas ponedoras y reproductoras, la cepa SB-1 del serotipo 2 se utiliza para la inmunización de aves combinada con la cepa HVT, actualmente se utilizan cepas del serotipo 1 atenuadas por pasajes en cultivo celular como la HPRS-16 y CVI988 (también conocida como la cepa Rispens) que generan protección contra cepas de campo de alta virulencia (2, 37).

A partir de los años 70 se han presentado rupturas en la protección conferida por las vacunas, las cepas utilizadas para la inmunización de las aves fueron perdiendo eficacia al momento que cepas de campo comenzaron a evolucionar y causar problemas en parvadas vacunadas (78). La introducción de cepas del serotipo 2 y cepas atenuadas del serotipo 1 (Rispens – CVI988) en los años 1990s generó una protección contra las posibles cepas virulentas que se encontraron en circulación; estas cepas vacunales comenzaron a utilizarse solas o en vacunas polivalentes (serotipo 1, 2 y 3) (2, 33).

La respuesta a la infección por el VEM está compuesta por la inmunidad innata (no específica) y la inmunidad adaptativa (específica), estos componentes deben ejercer su acción y modulación sobre los componentes celulares y moleculares propios de la

reacción inmunitaria frente a este agente infeccioso, la respuesta innata es un componente que se presenta de manera rápida, 1 y 2 días posterior a la infección con el VEM y la respuesta de tipo adaptativa se puede detectar entre los 5 y 7 días post-infección e incluye la formación de anticuerpos específicos y linfocitos T citotóxicos capaces de reconocer el antígeno, para eso es necesario que se genere una estimulación por parte de las citoquinas lo que permite el desarrollo de ambas respuestas. Para que se presente cualquiera de las dos respuestas deben ocurrir una serie de procesos encadenados con el fin de activar factores de señalización y las células efectoras de la respuesta, en los párrafos siguientes se explicarán estos mecanismos en detalle (15).

Los mecanismos de la respuesta inmune innata incluyen la activación de macrófagos y células asesinas (Natural Killer Cells - NK), secreción de interferon de tipo 1 (INF-1) y citoquinas proinflamatorias, inducción de receptores TLR y AMPs (receptores antimicrobiales) y producción de anticuerpos y los anticuerpos maternos (30).

Los macrófagos activados, pueden transportar el VEM desde el sitio de infección en los pulmones y transportarlo a órganos linfoides primarios, de ahí su importancia no sólo como células efectoras de la respuesta inmune, sino como parte de los mecanismos involucrados en la infección y el ciclo de vida del virus en las aves. Las células NK son la primera línea de defensa para eliminar células infectadas por el virus debido a que poseen serinas proteasas y proteínas que forman poros para reconocer las células y reconocen células tumorales a través de la granzina y la perforina, estas células son un componente muy importante en la respuesta ante la infección con cepas muy virulentas del VEM (73).

Los macrófagos inhiben la replicación viral a través de la inducción en la producción de oxido nítrico (NO) lo que ayuda en la reducción de los tumores producidos en la EM, la

respuesta de los macrófagos es mediada o potenciada por el factor de crecimiento mielocítico de las gallinas, lo que aumenta la tasa de diferenciación de monocitos a macrófagos y el aumento en las colonias de granulocitos, lo que resulta en un aumento de los prodesos de fagocitosis y producción de NO (73, 30).

Otro componente remarcable en la respuesta inmune frente a VEM son las citoquinas que se forman en las células por la presencia del virus, los primeros componentes en formarse para producir una actividad antiviral son los interferones de tipo 1 (INF-1), IFN-γ, IFN-α e IFN-β, en la infección por el VEM IFN-α e IFN-β tienen actividad antiviral y actúan como potente regulador del sistema inmune innato a través del potenciamiento de las células NK citotóxicas (79).

Existe una correlación positiva entre la replicación del VEM en la mucosa respiratoria y la expresión de Receptores Tipo Toll (Toll Like Receptors - TLRs) lo que lleva a pensar que ciertos Los patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns - PAMPs), derivados de la infección por el VEM se encuentran en gallinas (15), la respuesta inmune del ave es capaz de generar un mayor control frente a cepas vacunales atenuadas del serotipo 1 que contra cepas de campo, lo que demuestra las diferencias en las tasas de replicación del virus (41, 30).

Luego de la inducción de los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos, la respuesta de CD8+ (CTL) contra varias glicoproteínas de envoltura tiene un papel importante en el control de la infección del virus de la enfermedad de Marek, el fenotipo CTL expresado en aves es determinado por la expresión de CD3+ CD4- CD8+ TCRαβ1 igual al fenotipo expresado por células citotóxicas cuando hay inducción por cepas vacunales no oncogénicas de VEM, esta respuesta CTL también tiene un papel importante en la resistencia genética a la EM ya que puede ser expresada

fenotípicamente en aves resistentes a la enfermedad debido a la reasociación genética al momento de formar las células específicas en la inmunidad adquirida (15).

La producción de INF-α se ha observado en gallinas susceptibles a la EM, las cuales tienen acción sobre la replicación viral y potencia la acción de las células NK sobre las células tumorales de la EM, CXCL14 y RANTES se expresan en tumores de la EM, estás interleucinas son reguladas hacia su sobreproducción en cerebro, bazo y pulmones después de la infección con el VEM; una particularidad que poseen los VEM es la producción de una interleucina viral, la vIL-8 que funciona como quimioatrayente para células T facilitando la colonización de estas células por el virus y la replicación viral (83).

En la respuesta inmune contra el VEM también se produce en el bazo, cerebro y sangre un diverso repertorio de citoquinas de tipo 1 (IL-2, INF-γ, lL-12, IL-15, IL-16 e IL-18) y de tipo 2 (IL-3, IL-4, IL-13 y Factor de Crecimiento Transformante β) que pueden ser reconocidas en la fase citolítica temprana, latente y citolítica tardía y ayudan a modificar el desarrollo tumoral en gallinas infectadas con cepas oncogénicas altamente virulentas del VEM (73).

En estos órganos se puede presentar la influencia positiva de los genes de expresión de citoquinas por los diversos patotipos del VEM, demostrando que a mayor virulencia del virus, mayor expresión génica de citoquinas durante la fase citolítica y latente del virus (15), se ha demostrado que en epitelio del folículo plumoso de gallinas infectadas con el virus de la enfermedad de Marek la infiltración de células T es concomitante con la expresión de IL-18, IL-6, IFN-γ y genes del CMH clase I, en cerebro, la expresión de INF-α y citoquinas proinflamatorias es mayor cuando hay enfermedad neurológica asociada a cepas vv VEM (10).

Un componente adicional de la respuesta inmunitaria contra el VEM es el genético asociado a la resistencia o susceptibilidad (aproximadamente representa el 20% de actividad en la susceptibilidad a la enfermedad) de las aves a la enfermedad y a la influencia en la evolución viral, la mayor asociación significativa entre la resistencia genética a la enfermedad está dada por la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), las gallinas con los haplotipos B1, B4, B5, B12, B13, B15 y B19 del CMH son altamente susceptibles a los tumores, gallinas con haplotipos B6 y B14 tienen moderada resistencia a virus de la enfermedad de Marek y las aves con haplotipos B2, BQ y B21 del CMH son muy resistentes, esto se debe a que los genes involucrados en la formación de las moléculas del CMH [V(D)J] tienen alta variabilidad en su expresión así como los genes TH1, LY4, LY6, GH, SCYC1 y BU1 lo que ha demostrado que las aves posean alta variabilidad en su respuesta ante el VEM y por eso las diferentes formas en las características clínicas de la enfermedad según las aves que se infecten (16)

Cuando hay infección por cepas del VEM serotipo 1, en sangre se presenta un bloqueo en la inducción de la transcripción de genes de INF al primer día post infección generando una inmunosupresión relacionada con la oncogenicidad viral (10).

Los herpesvirus pertenecen a una amplia familia de virus DNA divididos en subfamilias (alfa) α-herpesviridae, (beta) β-herpesviridae y (gamma) γ-herpesviridae, los herpesvirus establecen una infección duradera en su hospedero y son ubicuos en humanos y animales; estas infecciones en algunas ocasiones son asintomáticas en individuos sanos, cuando se presenta la infección clínica puede causar enfermedad significativa y compromiso del sistema inmune de los individuos infectados. Los herpesvirus han seguido emergiendo a través de 400 millones de años durante la coevolución con los mamíferos, durante este tiempo, los herpesvirus han adquirido numerosos genes que codifican proteínas con una función primaria en la evasión de las

vías de la respuesta inmune, tal como la activación de la infección de largo tiempo (latencia viral) dentro de las células del hospedero, y la expresión de citoquinas quimiotáctica, esto ha incrementado las vías inhibitorias del sistema inmune influenciado por los brotes de infecciones por herpesvirus (1).

El gen LORF4 (UL1) que tiene un importante papel en la entrada del virus a la célula y la interacción con esta codifica la glicoproteína L (gL) que forma un complejo hetero-oligomérico con la glicoproteína H (gH) (44); la transformación celular es otro evento importante para desarrollar tumores linfoides en las aves por el VEM, UL39, UL41 son genes actividad transcripcional en la fase temprana de la infección del VEM (42); se reconoce claramente a Meq como gen más importante, un homólogo de oncogenes fos y jun, también se manifiesta durante la infección latente, cumple un papel importante en la transformación de células T, meq también se ha demostrado que bloquea la apoptosis de las células latentemente infectadas y transactivador de la expresión génica dependiendo de sus compañeros de dimerización y sitios de unión del genoma de VEM (14), otros genes virales colaboran con el mantenimiento y difusión del VEM es el caso de v-TR (6); así como UL14 puede funcionar en VEM replicación y transformación y la formación de tumores (39).

En la latencia de VEM participan diferentes genes para inducir este proceso, los antígenos asociados a latencia (LATs) que se asignan en antisentido al gen ICP4 (3), pp38 es una fosfoproteína que se expresa en células líticamente infectadas y células tumorales e implicado en reactivación de latencia (7), el gen de la ribonucleótido reductasa (RR) es necesario para la replicación del virus en las células no divididas, patogénesis viral y reactivación de latencia en las células del hospedero infectadas (20), el gen ICP22 ha sido descrito como transactivador y desempeña un papel en la regulación génica post-transcripcional inhibiendo el empalme génico (Splicing) del virus y la célula hospedera (49).

Otros genes del VEM han sido identificados en el desarrollo de la infección citolítica y evasión de la respuesta inmune del hospedero. Lipasa viral VEM (vLIP), se conserva entre los tres miembros del virus de la enfermedad de Marek a ser un factor de virulencia que realza la replicación viral con un papel potencial en la patogénesis viral y que puede señalar su papel en la modulación inmune (6, 43), el US3, una proteína quinasa de serina/therionine y UL49.5, una proteína de envoltura/tegumento no glicosilada, ambos implicados en la regulación del MHC clase I (7); vIL8 Quimocina CXC implicada en la infección citolítica temprana y atracción celular, pueden estar involucrados en la modulación replicación viral o respuesta inmune del hospedero (33), los genes asociados con parálisis transitoria (TP) podrían desempeñar un papel crucial en la inducción de lesiones patológicas que se encuentran en los tejidos nerviosos de las aves; el gen UL44 o glicoproteína (gC) y UL13, son esenciales para la transmisión horizontal (7, 44).

Una característica importante de las cepas del serotipo 1 del VEM es su virulencia, o sea, la habilidad para inducir lesiones linfoproliferativas en nervios, hígado, riñón, bazo, sistema reproductivo, corazón, piel y proventrículo (54). Estas lesiones están influenciadas por la presencia de infiltrado linfocitario lo que ha demostrado que a medida que la cepa se hace más virulenta el infiltrado linfocitario es mayor, esta característica ha servido para predecir la posible evolución continua de todas estas cepas en el tiempo para cambiar su virulencia, lo que sugiere que los tres serotipos pueden desarrollar rápidamente características biológicas y moleculares alteradas, indicando que pueden existir mutaciones espontáneas en su genoma (17, 45, 49); los cambios en la virulencia en las cepas de VEM han sido reconocidos desde 1970 y siguen progresando hasta ahora gracias a una serie de factores relacionados al virus y al hospedero (54). Esta virulencia se ha relacionado íntimamente con la clasificación patotípica, en la cual se designan cuatro tipos de virus relacionados como medio (mVEM), virulento (vVEM), muy virulento (vvVEM) y muy virulento plus (vv+VEM),

actualmente se sospecha de la presencia de patotipos que exceden la virulencia de vv+VEM y se ha informado por lo menos de una de esas cepas, la 584A (17, 31, 12).

Nuevos patotipos del virus están periódicamente emergiendo, en particular virus capaces de causar EM en gallinas vacunadas, lo que lleva a pensar que las propiedades inmunológicas conferidas por las vacunas en los individuos no son suficientes para contener al virus, esto se debe principalmente a su evolución (2, 45). Es de gran importancia conocer los signos característicos de la enfermedad como es la polineuritis y parálisis de las alas o las patas, inmunosupresión por la colonización del virus en órganos linfoides tales como bolsa de Fabricio, timo y bazo lo cual impide que haya una buena respuesta a la vacunación contra diferentes agentes infecciosos, pueden presentar problemas oculares debido al daño que se presenta en el iris (iridociclitis) y la enfermedad neoplásica visceral (49, 17, 54).

Es de entender que para que se presenten los signos clínicos en los animales el VEM ingresa al hospedero por inhalación de partículas de plumas o descamación de la piel de las aves infectadas por el virus en su forma libre (el virus se excreta por las células del folículo plumoso), una vez en el interior del ave (figura 1), estas partículas son transportadas a los pulmones y allí el virus es tomado por los macrófagos alveolares, transportado y transferido a linfocitos B, luego por mecanismos de presentación antigénica es transferido a los linfocitos T, en donde comienza a replicarse y puede desarrollar tumores linfoides; en los linfocitos T, el VEM puede permanecer en estado de latencia y permanecer por tiempo indeterminado hasta que ocurran cambios celulares que permitan al virus reactivar el proceso de replicación y su ciclo patogénico, para que el virus entre a las células es necesario que interactúe con RabIIA la cual pertenece a la familia de las Rab GTPasas que son mediadoras en la formación de vesículas para el tráfico y fusión del virus con la membrana de la célula, esto permite el transporte intracelular del VEM (10), luego la replicación y al final de la cual, es

excretado en las células del folículo plumoso (56), esta forma de excreción permite que el virus pueda permanecer por mucho tiempo en el ambiente en el polvo y la caspa que se encuentra en los galpones y llegar a transmitirse de una parvada a otra dentro de las granjas.

Desde 1970 se han implementado planes de vacunación para controlar la enfermedad, el método utilizado para la inmunización de las aves es la aplicación de la vacuna por vía subcutánea el primer día de nacida de las aves o la aplicación in ovo al día 18 del periodo embrionario este esquema comenzó con la utilización de la cepa atenuada del serotipo 1 (HPRS-1), seguida del desarrollo de la vacuna con herpesvirus de pavo HVT, sin embargo, los brotes subsecuentes a la introducción de esta vacuna llevaron a la generación de vacunas bivalentes de HVT con cepas del serotipo 2 en los años 1980s (49); a mediados de 1990s se presenta una nueva etapa de brotes de EM y se introdujo una nueva vacuna con la cepa CVI988 atenuada y perteneciente al serotipo 1 (49, 45).

Por otra parte, las vacunas inducen inmunidad no estéril, pero previenen la formación de tumores, aunque no previenen la infección con cepas de campo circulantes de VEM (32, 49), los mecanismos de inmunidad celular y humoral que genera la vacunación con la cepa HVT contra VEM se manifiestan principalmente por la reducción de los niveles de infección latente, potencian los efectos de las células asesinas naturales (NK) para destruir linfocitos B infectados con virus, ayudan en la producción de interferon gamma por las células asesinas naturales o macrófagos lo que genera una actividad antiviral y la producción de linfocitos T citotóxicos antígeno específicos, lo que ayuda en el desarrollo de la respuesta inmune de memoria de tipo celular, además de ayudar a eliminar células infectadas con VEM en un periodo de 3 y 7 días después de la vacunación (40)

Son muchos los genes involucrados en la resistencia y la susceptibilidad frente al VEM, todos son sobre-expresados durante el proceso de replicación viral al interior de la célula, modificando la respuesta inmune de las aves y permitiendo que se presente la enfermedad tumoral en las aves, hasta ahora han sido descubiertos 108 genes involucrados en la resistencia a la EM, algunos de ellos son: Hormona de crecimiento (GH), Antígeno 2 de células madre (SCA2) o precursor de antígeno de Linfocito (LY6E), cadena B del complejo mayor de histocompatibilidad (BLB o CD74), CD79B, (46)

El gen CTLA4, Interferon de tipo 1 (IFNA), Interferon tipo 2 (IFNG), interleucinas y receptores de interleucinas (IL-6, IL-8, IL-13R2A e IL18), quimoquinas proinflamatoria (CCLi7, CCL12, CCLi6, CCLi3, CCL17 y CCL19), respuesta factor regulatorio de interferon (IRF1, IFIH, IFIT-Like), oxido nítrico sintetasa inducible (NOS2A), Proteína específica de quiescencia (P20K), proteasa proinflamatoria granzina A (GZMA), receptor TLR3, TLR1B, TLR15 y TLR21, genes de Lisozimas (LYG2), genes avidina (AVD), genes IRG1, MDV1, genes mitocondriales que codifican fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, NADH deshidrogenasa subunidad 4, concavalina A, factor de mantenimiento de la latencia (LMF), hacen parte del repertorio de genes celulares que se activan cuando el virus comienza su reactivación después del estado de latencia (30).

La hipótesis por la cual algunos de los genes activados generan resistencia a la EM se debe a 1) la expresión de los genes puede causar pérdida del receptor del VEM; 2) ayudar a limpiar las células infectadas, 3) afectar el ciclo de vida del virus, y 4) prevenir la transformación de células infectadas (15, 51, 30).

Impacto de la enfermedad de Marek en los sistemas productivos

La EM se presenta en las aves de corral alrededor del mundo y tiene consideraciones importantes ya que puede generar grandes pérdidas económicas en la industria avícola, Colombia es un país con vocación avícola, uno de los datos más relevantes en este tema es la cantidad de aves encasetadas en el año 2013 siendo 633.398.882 de pollos con un crecimiento del 3% con respecto al año 2011 y 32.628.184 de pollitas con un crecimiento de 8.7% con respecto a 2012 (Programa de estudios económicos – FENAVI 2013) lo que genera que sea a nivel pecuario uno de los sistemas productivos con mayor importancia en el país y por tal motivo ha generado a partir de la Federación colombiana de Avicultores (FENAVI) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) que se generen diferentes medidas para prevenir la presentación de la EM.

Es de gran interés comprender que en Colombia es obligatoria la vacunación contra la EM en las incubadoras (Resolución ICA 00587 de 1973), por tal motivo todas las aves de 1 día de nacidas que llegan a las granjas de producción son vacunadas; en condiciones de sanidad avícola, no se entiende a la EM como una posible causa de afección en aves de corral, puesto que los signos que se presentan pueden ser muy inespecíficos o enmascararse con otras enfermedades, lo que puede generar fallas en la producción de huevo o carne ya que se sobreentiende que todas las aves están protegidas por la el efecto generado con la vacunación y que en nuestro país no se presenta la enfermedad clínica por la poca vigilancia que se hace de esta o el desconocimiento de los signos. Según la Organización Internacional de Sanidad Animal (Animal Health International Organization OIE por sus siglas en inglés) desde el año 2000 hasta el 2012 se han reportado en Colombia 1,059,405 animales aparentemente con signos clínicos compatibles, todos ellos diagnosticados por medio de los análisis hitopatológicos, con un total de 160,666 aves muertas, esto quiere decir un 15.17% de mortalidad no determinado en, ningún caso se determinó cuál era el serotipo causante

de la enfermedad (http://www.oie.int). Lo anterior demuestra que es un agente que se encuentra presente en nuestro país generando problemas en el estado sanitario de las aves.

En diferentes países la EM es una entidad frecuente en las aves de corral, ya que puede presentarse de diversas formas en las aves: cutánea, visceral, nerviosa y ocular. El desconocimiento de los serotipos circulantes en nuestro país conlleva a que se estén generando problemas a causa del VEM y pasen desapercibidos por los clínicos y los productores hasta el punto de tener el agente infeccioso presente y no saber las medidas de acción en contra de este (17, 19). La aplicación de las diferentes vacunas contra el VEM también ha generado alarma entre productores y médicos veterinarios en el mundo, ya que se le atribuye a estas la capacidad de evolución que ha tenido el VEM para poder evadir la respuesta inmune de las aves y causar enfermedad (2, 49).

Ante el inminente cambio genómico que se viene presentando en los diversos serotipos del VEM, casos de China, Rusia, India y Polonia, lo que llevó a los investigadores a hablar de la evolución del virus hacia nuevos serotipos con mayor virulencia y capacidad de romper la protección inmunológica que confieren las vacunas. En el mundo se han venido planteando estudios diversos acerca de la patogénesis, los cambios fenotípicos del virus y los diversos planes vacunales dada la preocupación por el aumento de casos que se presentan en diferentes países (40, 49, 19, 20).

Dada la carencia de investigación que existe en Colombia acerca de la presentación de la EM y de la presencia de los virus que causan la enfermedad, no se ha podido determinar la presencia de los diversos serotipos del virus que generaron signos clínicos de la enfermedad en aves presentes en las zonas de influencia productiva avícola (http://www.oie.int).

Además de aportar al conocimiento del estado epidemiológico molecular de la EM, este trabajo representa un paso inicial en las investigaciones en la línea de virología e inmunología aviar en la Universidad de Antioquia.

Este trabajo fue propuesto para comprobar la presencia del virus de la enfermedad de Marek en muestras de casos positivos diagnósticado por histopatología, la hipotesis que se planteó resolver es la confirmación de la presencia del virus en tejidos y posiblemente cepas oncogénicas en los diversos sistemas productivos en los cuáles se diagnosticó la enfermedad por medio de inmunohistoquímica y de PCR según la región estudiada y el órgano analizado.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Obtener información sobre el virus de la enfermedad de Marek presente en muestras de casos positivos desde el año 2002 hasta el 2012 en Colombia

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Identificar la presencia de proteínas virales por medio de Inmunohistoquímica en muestras diagnosticadas positivas

4.2.2. Determinar la presencia de genes asociados con virulencia por medio de la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).

5. Capítulo 1:

Marek Disease Virus: molecular approach to the virus and host immune response

Virus de la Enfermedad de Marek: aproximación molecular al virus y respuesta inmune del hospedero

Vírus da doença de Marek: abordagem molecular do vírus e a resposta imune do hospedeiro

Pablo Andres Lopera Toro[1*], MV, cPhD; Juan Carlos Rodríguez-Lecompte[2], PhD

[1*]Estudiante Doctorado en Ciencias Animales. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias; Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. E-mail: pabloandreslopera@gmail.com

[2]Profesor Asociado en Inmunología y Patología Avíar. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, P.E.I.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

CES MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Artículo de revisión

Marek Disease Virus: molecular approach to the virus and host immune response

Virus de la Enfermedad de Marek: aproximación molecular al virus y respuesta inmune del hospedero

Vírus da doença de Marek: abordagem molecular do vírus e a resposta imune do hospedeiro

Pablo Andrés Lopera Toro[1] MV, cPhD CvLAC, Juan Carlos Rodríguez-Lecompte[2] PhD CvLAC

Fecha correspondencia:
Recibido: 16 de julio de 2015.
Aceptado: 27 de septiembre de 2016.

Forma de citar:
Lopera Toro PA, Rodríguez-Lecompte JC. Virus de la Enfermedad de Marek: aproximación molecular al virus y respuesta inmune del hospedero. Rev. CES Med. Zootec. 2016; Vol 11 (3): 71-85.

Open access
© Copyright
Creative commons
Éthics of publications
Peer review
Open Journal System
e-ISSN 1900-9607

Sobre los autores:

[1] Estudiante Doctorado en Ciencias Animales. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín, Colombia.

[2] Profesor Asociado en Inmunología y Patología Avíar. Department of Pathology and Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, P.E.I.

Comparte

Abstract

Marek's disease virus affects dramatically the production of broiler chicken, hens breeding and commercial due to lost causes for carcass condemnation, presence of tumors and high mortality. Give them us derivatives by the VEM they affect significant economic losses in the poultry industry worldwide and impact the comprehensive management of poultry health and health in general. The genetic and molecular characteristics of the VEM highlight the diversity of the genome in each of the 3 serotypes of the virus; genes involved in pathogenicity, evasion of the immune response and replication strategies are consistent with the difficulty of their infection control. Viral latency and the pump of the immune response of the host, particularly the control of type I interferons, are the mechanism to help the perpetuation in the poultry and thus hamper their effective environmental control. All those conditions have allowed that the virus evolves to forms more virulent that with the use of the vaccines current does not provide a protection adequate against these; for this reason, it is necessary to reconsider current vaccination plans to improve the immune response of active type, particularly involving cell type, to control his evasion and control on the immune system.

Keywords: *Gallid Herpesvirus 2, Immune system, Interferon type 1, Marek's disease, Viral latency, Virulence.*

Resumen

El virus de la enfermedad de Marek afecta dramaticamente la producción de pollo de engorde, gallinas comerciales y reproductoras debido a las perdidas causas por decomisos en mataderos, presencia de tumores y alta mortalidad. Las daños derivados por el VEM repercuten en pérdidas económicas significativas en la industria avícola mundial e impactan el manejo integral de la sanidad y salud avícola en general. Las características genéticas y moleculares del VEM resaltan la diversidad genómica en cada uno de los tres serotipos del virus; genes involucrados en sus estrategias de replicación, patogenicidad y evasión de la respuesta inmune son consistentes con la dificultad del control de su infección. La latencia viral

Resumen en inglés

Marek's disease virus affects dramatically the production of broiler chickens, Broiler breeders and commercial layers hens breeding and commercial due to losses including carcass condemnation, presence of tumors and high mortality. Give them us derivatives by the VEM they affect significant economic losses in the poultry industry worldwide and impact the comprehensive management of poultry health in general. The genetic and molecular characteristics of the VEM highlight the diversity of the genome in each of the 3 serotypes of the virus; genes involved in pathogenicity, evasion of the immune response and replication strategies are consistent with the difficulty of their infection control. Viral latency and the evasion of the immune response of the host, particularly the control of type I interferons, are the mechanism to help the perpetuation of the virus in poultry and thus hamper their effective environmental control. All those conditions have allowed that the virus evolves to forms more virulent that even with the use of the current vaccines does not provide an adequate protection against the disease; for this reason, it is necessary to reconsider current vaccination plans to improve the immune response of active type, particularly involving cell type, to control this evasion and control on the immune system.

Resumen en español

El virus de la enfermedad de Marek afecta dramáticamente la producción de pollo de engorde, gallinas comerciales y reproductoras debido a las pérdidas causadas por decomisos en mataderos, presencia de tumores y alta mortalidad. Las daños derivados por el VEM repercuten en pérdidas económicas significativas en la industria avícola mundial e impactan el manejo integral de la sanidad y salud avícola en general. Las características genéticas y moleculares del VEM resaltan la diversidad genómica en cada uno de los 3 serotipos del virus; genes involucrados en sus estrategias de

replicación, patogenicidad y evasión de la respuesta inmune son consistentes con la dificultad del control de su infección. La latencia viral y la evación de la respuesta inmune del hospedero, particularmente el control de interferones tipo I, son los mecanismos que ayudan a la perpetuación en las granjas avicolas y por ende dificultan su efectivo control medio ambiental. Todas esas condiciones han permitido que el virus evolucione a formas más virulentas que con el uso de las vacunas actuales no proporcionen una protección adecuada contra estas; por eso, se hace necesario replantear los planes actuales de vacunación para mejorar la respuesta inmune de tipo activo, involucrando particularmente la de tipo celular, para controlar su evasion y control sobre el sistema inmune.

Palabras clave: Gallid Herpesvirus 2, Sistema inmune, Interferón tipo 1, Enfermedad de Marek, Latencia viral, Virulencia (Recurso: MeSH)

Resumen en portugués

O vírus da doença de Marek afeta drasticamente a produção de frango de engorda, galinhas poedeiras comerciais e reprodução devido a eles causas perdidas por convulsões em matadouros, presença de tumores e alta mortalidade. Dar-lhes nos derivados pelo VEM que afectem perdas económicas significativas na indústria avícola em todo o mundo e afetar o gerenciamento abrangente de saúde das aves e saúde em geral. As características genéticas e moleculares do VEM destacam a diversidade do genoma em cada um dos 3 sorotipos do vírus; genes envolvidos em suas estratégias de replicação, patogenicidade e evasão da resposta imune são consistentes com a dificuldade do controle de sua infecção. Latência viral e a bomba da resposta imune do hospedeiro, especialmente o controle de interferons do tipo I, são o mecanismo para ajudar a perpetuação em aves de capoeira e, assim, dificultar o seu controle ambiental eficaz. Todas essas condições permitiram que o vírus evolui para formas mais

virulentas que com o uso das vacinas atuais não fornece uma proteção adequada contra estes; por isso, é necessário faz-los repensar corrente de planos de vacinação para melhorar o imune resposta do tipo ativo, envolvendo particularmente o de célula do tipo, para controlar sua evasão e controle sobre o imunológico do sistema.

5.1. Introducción

El virus de la Enfermedad de Marek (VEM) es uno de los agentes infecciosos aviares con mayor impacto en la producción de pollos y reproductoras de engorde, gallinas ponedoras, la Enfermedad de Marek (EM) es causada por este agente y tiene gran importancia en muchos países ya que se pueden presentar decomisos y mortalidad que afectan la economía de la industria avícola (29)

Las características genéticas y moleculares del VEM han sido evaluadas y documentadas a través publicaciones científicas, las cuales reportan en consenso la diversidad genética que poseen cada uno de los serotipos del virus, las características genéticas hacen que este virus tenga singulares estrategias en su replicación, las cuales afectan considerablemente la respuesta inmune del ave a la infección y la efectividad en controlar su infección y diseminación debido principalmente a la producción de interferones que actúan directamente sobre la respuesta inmune innata contra el virus (28, 29). Esto permite que el virus evolucione en el tiempo evitando su exposición al sistema inmune, impidiendo su eliminación del hospedero e incrementado su patogénesis (45, 49).

El objetivo de esta revisión es dar a conocer las diferentes características moleculares del virus de la enfermedad de Marek y cuáles son los genes implicados en la patogénesis.

5.2. Herpesvirus

Los herpesvirus pertenecen a la familia Herpesvirinae y están divididos en subfamilias (alfa) α-herpesviridae, (beta) β-herpesviridae y (gamma) γ-herpesviridae, tienen la

habilidad de establecer una infección permanente en su hospedero y son ubicuos en humanos y animales (1, 30, 40).

Poseen la capacidad de generar infecciones asintomáticas en individuos sanos, sin embargo cuando se presenta la infección clínica pueden causar enfermedad significativa comprometiendo varios sistemas orgánicos de las aves y en principal instancia el sistema inmune de las aves infectadas (1, 28).

Los herpesvirus se han encontrado a través del tiempo durante la coevolución con los mamíferos y han adquirido numerosos genes que codifican proteínas con una función importante en la evasión de las vías de la respuesta inmune, tal como la activación de la infección por largo tiempo (latencia viral) dentro de las células del hospedero, y la expresión de citoquinas quimiotácticas capaces de activar mecanismos con los cuales pueden infectar los linfocitos T cuando son llamados a cumplir funciones propias de defensa en un órgano en particular (1, 50).

5.3. Virus de la Enfermedad de Marek y clasificación patotípica

El VEM tiene propiedades linfotrópicas similares a las de los Gammaherpesvirus (2); sin embargo, su estructura molecular y organización genómica son similares a los de los Alfaherpesvirus (3, 40).

El VEM también llamado Gallid Herpesvirus tipo 2 (GaHV-2) posee tres serotipos que se diferencian por su genoma, 1) las cepas del serotipo 1 son oncogénicas, infectan pollos y gallinas tales como las cepas GA ,Md11, y Md5; 2) el serotipo 2 infecta pollos y gallinas y la cepa más conocida es la SB-1 y 3) el serotipo 3 Herpesvirus de Pavo (HVT), infecta pavos. Los serotipos 2 y 3 son no oncogénicos y no tienen capacidad patogénica alta como el serotipo 1 (12, 34, 48, 59).

Las cepas del serotipo 1 del VEM tienen la habilidad para inducir lesiones linfoproliferativas en nervios, hígado, riñón, bazo, sistema reproductivo, corazón, piel y proventrículo (13). Estas lesiones están influenciadas por la presencia de infiltrado linfocitario lo que ha demostrado que a medida que la cepa se hace más virulenta el infiltrado linfocitario es mayor lo que puede conducir a la atrofia del timo y la Bolsa; esta característica ha servido para predecir prever que todas estas cepas han tenido una evolución continua en el tiempo para cambiar su virulencia (29, 49, 53, 59), lo que sugiere que los tres serotipos pueden desarrollar rápidamente características biológicas y moleculares alteradas, indicando que pueden existir mutaciones espontáneas en su genoma (14, 15, 16).

Los cambios en la virulencia en las cepas del VEM han sido reconocidos desde 1970 y siguen progresando hasta ahora gracias a una serie de estudios sobre factores relacionados al virus y al hospedero (13)

La virulencia se ha relacionado íntimamente con la clasificación patotípica, en la cual se designan cuatro tipos de virus relacionados como medio (mVEM), virulento (vVEM), muy virulento (vvVEM) y muy virulento plus (vv+VEM), actualmente se sospecha de la presencia de patotipos que exceden la virulencia de vv+VEM y se ha informado por lo menos de una de esas cepas, la 584A (2, 14, 17, 31, 35).

5.4. Características genómicas y proteómicas del virus de la enfermedad de Marek

El genoma del VEM está compuesto por una doble cadena de ADN, en su estructura posee regiones únicas largas (UL) y regiones únicas cortas (US), rodeadas por regiones

invertidas repetidas largas y cortas. La longitud del genoma de cada uno de los serotipos varía, siendo el serotipo 1 el más largo (3).

En la secuencia de eventos desde la entrada del virus a la célula hasta su salida, describiremos los genes que están involucrados en estos procesos:

El gen LORF4 (UL1) tiene un importante papel en la entrada del virus a la célula, ya que codifica para la formación de glicoproteínas de superficie: la interacción del virus con la célula permite que se una el complejo glicoproteína L (gL) con la glicoproteína H (gH) del virus para la interacción con los receptores nectina 1 de la célula hospedera (4, 44).

Luego de la entrada del virus a la célula, este debe de realizar un recorrido por su interior para llegar al núcleo en donde se replica, pasando por el citoplasma a través de la unión con el citoesqueleto para luego introducir su genoma por el poro nuclear para unirse episomalmente al genoma del hospedero, allí comienza el proceso de transcripción, en estos mecanismos no son muy conocidos los genes virales que intervienen en el transporte intracelular del virus.

Después del proceso de transcripción de los genes del virus comienza la formación de proteínas que ayudan en la transformación lo que permite el desarrollo de tumores linfoides en las aves; los genes UL39, y UL41 tienen actividad transcripcional en la fase temprana de la infección (5). Se reconoce claramente a Meq como un gen importante por su actividad oncogénica, un homólogo de oncogenes fos y jun, expresados durante la infección latente y cumplen un papel importante en la transformación de células T (5, 6, 50).

Meq también puede bloquear la apoptosis de las células latentemente infectadas y es transactivador de la expresión génica dependiendo de sus compañeros de dimerización

y sitios de unión del genoma del VEM (6). Otros genes virales colaboran con el mantenimiento y difusión del VEM, es el caso de v-TR7; así como UL14 puede funcionar en la replicación del virus y la transformación celular y la formación de tumores (8).

En la latencia del VEM participan diferentes genes para inducir este proceso, los transcriptos asociados a latencia (LATs) que se asignan en antisentido al gen ICP4 (9, 50). pp38 es una fosfoproteína que se expresa en células líticamente infectadas y células tumorales, está implicada en la reactivación de la latencia viral (5, 50). Otro gen implicado en la reactivación de la latencia es el gen de la ribonucleótido reductasa (RR) el cual también es necesario en la patogénesis viral (10, 50).

El gen ICP22 ha sido descrito como transactivador y desempeña un papel en la regulación génica post-transcripcional inhibiendo el empalme génico Splicing del virus y la célula hospedera (11).

Los genes asociados con parálisis transitoria (TP) podrían desempeñar un papel crucial en la inducción de lesiones patológicas que se encuentran en los tejidos nerviosos de las aves; el gen UL44 o glicoproteína (gC) y UL13, son esenciales para la transmisión horizontal (4, 5).

El gen US3 codifica para una proteína quinasa de serina/therionine y el gen UL49. (5), codifica una proteína de envoltura/tegumento no glicosilada, ambos implicados en la regulación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad - MHC clase I (5). El VEM posee un gen el cual codifica una interleucina viral, la vIL8 es una quimocina CXC implicada en la infección citolítica temprana y atracción celular, estos genes pueden estar involucrados en la modulación de la replicación viral o respuesta inmune del hospedero (12, 33, 42).

5.5. Patogénesis de la Enfermedad de Marek

El ingreso al hospedero se realiza por inhalación del virus, el cual se encuentra presente en su forma libre de células en la descamación de la piel y en el folículo plumoso de las aves infectadas (19, 28)

Una vez en el interior del ave (figura 1), el virus es transportado a los pulmones y es capturado por los macrófagos alveolares, transportado y transferido a linfocitos B, posteriormente por mecanismos de presentación antigénica es transferido a los linfocitos T, en donde comienza a replicarse y puede comenzar la transformación de las células (19, 30, 38).

En los linfocitos T, el VEM puede permanecer en estado de latencia por tiempo indeterminado hasta que ocurran cambios celulares que permitan al virus reactivar el proceso de replicación y su ciclo patogénico (19, 50).

Para que el virus entre a las células es necesario que interactúe con RabIIA la cual pertenece a la familia de las Rab GTPasas que son mediadoras en la formación de vesículas, tráfico y fusión del virus con la membrana de la célula, esto permite el transporte intracelular del VEM (19), luego la replicación y al final de la cual, es excretado en las células del folículo plumoso (20), permitiéndole a el virus permanecer por largos periodos en el ambiente bien sea en el polvo o la exfoliación epitelial (caspa) que se encuentra en los galpones y llegar eventualmente a transmitirse de una parvada a otra dentro de las granjas.

5.6. Signos clínicos de la Enfermedad de Marek

La enfermedad de Marek comprende inmunosupresión, parálisis, debilidad crónica, desarrollo de linfomas y ceguera, los síntomas varían en severidad según la cepa del virus, el genotipo del ave y el estatus vacunal, en algunas ocasiones puede haber muerte de las aves susceptibles o de las que no son vacunadas (59), los signos clínicos característicos son polineuritis y parálisis de las alas o las patas, inmunosupresión por la colonización del virus en órganos linfoides tales como Bolsa de Fabricio, timo y bazo lo cual impide que haya una buena respuesta a la vacunación contra diferentes agentes infecciosos, pueden presentar problemas oculares debido al daño que se presenta en el iris (iridociclitis) y la enfermedad neoplásica visceral (16, 14, 18, 28).

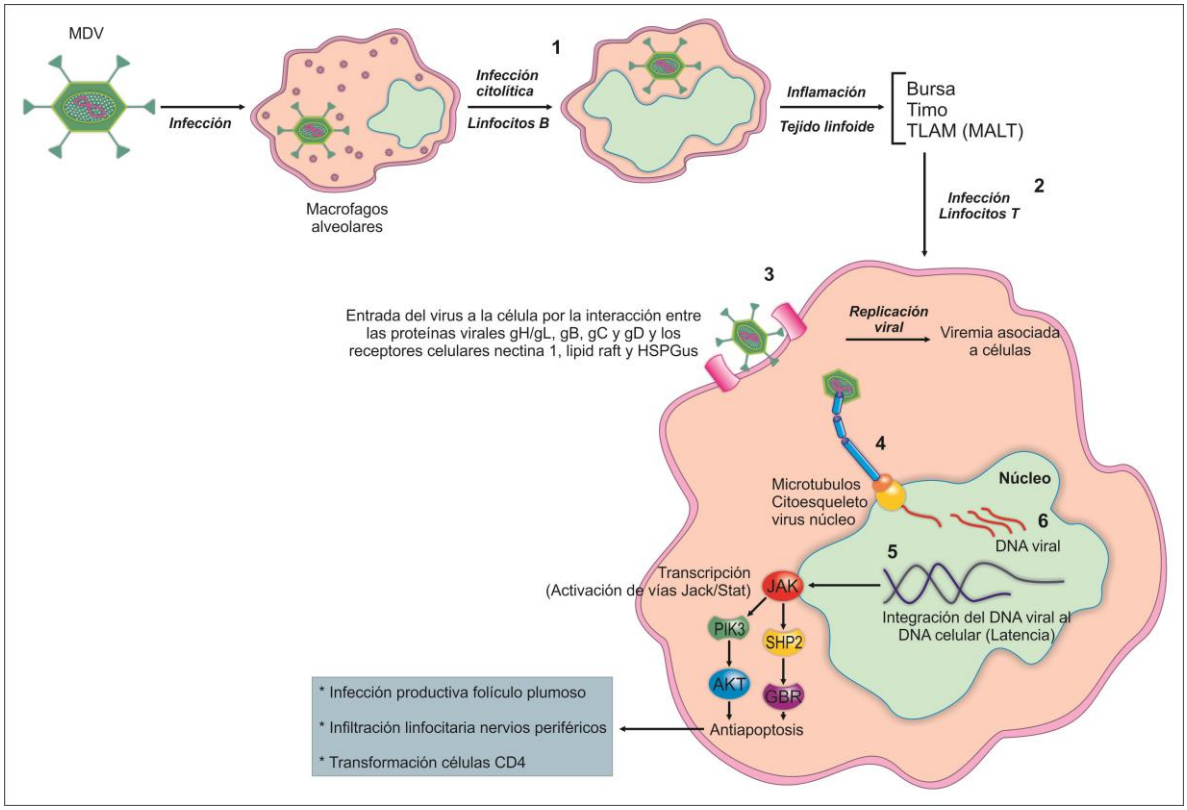

Figura 1. Secuencias de eventos celulares y virales durante la infección del virus de la Enfermedad de Marek: 1) En los estadios iniciales de la infección el VEM hace un tránsito no replicativo en macrófagos y linfocitos B en tejido linfoide (Bolsa de Fabricio, Timo, Tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT); 2) Se genera una reacción inflamatoria con la migración de linfocitos T, los cuales son la célula blanco del VEM; 3) Las proteínas virales estructurales gH/gL, gB, gC y gD interactúan con receptores celulares de nectina 1, lipid raft y HSPG facilitando la infección; 4) La cápside viral migra hasta los poros nucleares donde libera el ácido nucléico viral (ADN) hacia el núcleo celular; 5) La replicación viral nuclear puede activar bien sea la vía Jack/Stat o fosfoproteinkinasa que estimula la producción de transcriptos de genes anti-apoptóticos que favorecen la transformación de las células T CD4; 6) La presencia del ADN viral alrededor del núcleo (Episomal) es la forma típica de presencia continua del

virus en la célula infectada conocida como latencia; esto le permite al virus reactivarse en condiciones de estrés celular y generar nuevos viriones infecciosos que infectaran más células (19, 30, 38, 47, 50).

5.7. Vacunación contra el virus de la Enfermedad de Marek

Desde 1970 se han implementado planes de vacunación para controlar la enfermedad, los métodos utilizados para la inmunización de las aves se basan en la aplicación de la vacuna in ovo al día 18 del periodo embrionario o por vía subcutánea al primer día de nacidas, actualmente se tienen varios esquemas de vacunación dependiendo de la condición geográfica y epidemiológica de la enfermedad, la vacuna Rispens o CVI988 es la más efectiva contra VEM muy virulento (vv) y muy virulento + (vv+), la vacunación de aves con las cepas HVT o SB-1 también previene la EM, pero es menos efectivo contra cepas vv y vv+ (15, 16, 21, 30, 31, 41, 59). La infección de linfocitos B y T por los virus vacunales interfiere con los procesos de infección de VEM virulentos lo que contribuye con un efecto protector. Otro componente benéfico de las vacunas es la interferencia con la infección de cepas virulentas en el Epitelio del Folículo Plumoso de las aves lo que resulta en una disminución en la transmisión del virus (59). Los diferentes manejos de las vacunas tales como la disminución de la dosis a aplicar (la dilución de la vacuna) y la mezcla con antibióticos pueden determinar un efecto poco protectivo de la vacuna en las aves (37, 15, 22).

5.8. Respuesta inmune frente a la infección por el VEM

Los mecanismos de inmunidad celular y humoral que genera la vacunación con la cepa HVT contra VEM se manifiestan principalmente por la reducción de los niveles de infección latente, potencian los efectos de las células asesinas naturales (NK) para destruir linfocitos B infectados con virus, ayudan en la producción de interferón gamma

por las NK o macrófagos lo que genera una actividad antiviral y la producción de linfocitos T citotóxicos antígeno específicos, lo que ayuda en el desarrollo de la respuesta inmune de memoria de tipo celular, además de ayudar a eliminar células infectadas con MDV en un periodo de 3-7 días después de la vacunación (20, 36).

Los macrófagos activados pueden transportar el VEM desde el sitio de infección en los pulmones a órganos linfoides primarios y secundarios (9), los macrófagos inhiben la replicación viral a través de la producción de oxido nítrico (NO) lo que consecuentemente ayuda al control viral y la reducción de los tumores producidos en la EM; la respuesta de los macrófagos es mediada o potenciada por el factor de crecimiento mielocítico de las gallinas que permite incrementar la tasa de diferenciación de monocitos a macrófagos en tejidos y el aumentar en número de granulocitos (heterófilos en aves), lo que resulta en un aumento de los procesos inflamatorios de resolución contra patógenos mediante la fagocitosis y producción de NO (9, 24)

Las citoquinas que se forman en las células por el estimulo e interacción entre células inmunes y la presencia del virus, en primera instancia son los interferones de tipo 1 (INF-1), IFN-γ, IFN-α e IFN-β y actúan como potentes reguladores del sistema inmune innato a través del potenciamiento de las células NK citotóxicas (23)

Las células NK son la primera línea de defensa del sistema inmune innato y adquirido para eliminar células infectadas por el virus; después del reconocimiento mediante receptores de superficie de cambios en el CMH I o del reconocimiento de antígenos virales mediante anticuerpos unidos a sus receptores en las NKs, estas inician un proceso citotóxico; las células NK poseen enzimas tipo serinas y otras proteasas que inducen la formación de poros en la membrana celular y activan un proceso enzimático lítico (por medio de las perforinas y granzinas) que destruyen células infectadas

mediante apoptosis. Este proceso es importante en la respuesta inmune de las aves ante la infección con cepas muy virulentas del virus de la enfermedad de Marek (24).

La producción de CXCL14 y RANTES se expresan en células tumorales de la EM, estás interleucinas son reguladas en cerebro, bazo y pulmones después de la infección con VEM. (9) Adicionalmente, cuando hay infección por cepas del VEM del serotipo 1, en la sangre se presenta un bloqueo en la inducción de la transcripción de genes de INF al primer día post infección generando una inmunosupresión relacionada con la oncogenicidad viral (19).

La respuesta de CD8+ (CTL) contra varias glicoproteínas de envoltura tiene un papel importante en el control de la infección del VEM, el fenotipo CTL expresado en aves es determinado por la expresión de CD3+ CD4- CD8+ TCRαβ1 igual al fenotipo expresado por células citotóxicas cuando hay inducción por cepas vacunales no oncogénicas de VEM; este tipo de respuesta CTL también tiene un papel importante en la resistencia genética a EM ya que puede ser expresada fenotípicamente en aves resistentes a la enfermedad debido a la reasociación genética al momento de formar las células específicas en la inmunidad adquirida (23, 32).

Ha sido reconocido que la respuesta inmune de las aves contra el VEM es mas fuerte contra cepas vacunales atenuadas del serotipo 1, que contra cepas de campo, lo que demuestra las diferencias antigénicas del virus (10).

Además de la respuesta por parte de las CD4+ ayudantes (Th2) que reconocen los péptidos en la superficie de las células B a través del CMH II, las células CD8+ citotóxicas actúan bien sea en células infectadas con virus o células tumorales; es de resaltar que el VEM es estrictamente asociado a células y la respuesta mediada por

anticuerpos no es considerada como la más importante comparada con la mediada por células Th (24).

En la respuesta inmune contra el VEM también se producen en el bazo, cerebro y sangre citoquinas de tipo Th1(IL-2, INF-γ, IL-12, IL-15, IL-16 e IL-18) y de tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-13 y Factor de Crecimiento Transformante β) que pueden ser reconocidas en la fase citolítica temprana, latente y citolítica tardía y ayudan a modificar el desarrollo tumoral en gallinas infectadas con cepas oncogénicas altamente virulentas del VEM (9).

Existe una correlación positiva entre la replicación del VEM en la mucosa respiratoria y la expresión de TLRs lo que lleva a pensar que ciertos PAMPs derivados de la infección por VEM interactúan con los patrones de receptores reconocimiento presentes en las en gallinas infectadas (23).

5.9. Genes asociados con la susceptibilidad y resistencia a la enfermedad

Son muchos los genes de las aves de los cuales se especula que están relacionados con la respuesta inmune e involucrados en la resistencia o la susceptibilidad frente al VEM, todos son sobre-expresados durante el proceso de replicación viral al interior de la célula y pueden inducir la formación de proteínas que ayudan al cambio morfológico de la célula (39, 56) (figura 2),

Uno de los mayores efectos que tienen los genes asociados al virus es la de producir factores quimotácticos de células T para poder infectarlas permitiendo que se presente la enfermedad tumoral en las aves; algunos de los genes involucrados en la resistencia al VEM son la hormona de crecimiento (GH), antígeno 2 de células madre (SCA2) o precursor de antígeno de Linfocito (LY6E), cadena B del complejo mayor de histocompatibilidad por medio de la reducción de la expresión de las glicoproteínas del

CMH B clase I (BLB o CD74), CD79B durante la replicación lítica viral como mecanismo de la evasión de la respuesta inmune, esta reducción en la expresión de las moléculas en la superficie celular no se presenta durante la latencia, sin embargo, una expresión genómica mínima viral y la integración a los telómeros de la célula hospedera son suficientes para la evasión de la respuesta inmune (26, 46, 59).

Durante el proceso de defensa del hospedero contra el virus para permitir que el sistema inmune del ave pueda montar una respuesta efectiva, genes como CTLA (4), Interferón de tipo 1 (IFNA), Interferón tipo 2 (IFNG), interleucinas y receptores de interleucinas (IL-6, IL-8, IL-13R2A e IL18) (57, 58), quimoquinas proinflamatoria (CCLi7, CCL12, CCLi6, CCLi3, CCL17 y CCL19), respuesta factor regulatorio de interferón (IRF1, IFIH, IFIT-Like), óxido nítrico sintetasa inducible (NOS2A), Proteína específica de quiescencia (P20K), proteasa proinflamatoria granzina A (GZMA), receptor TLR3, TLR1B, TLR15 y TLR21, Lisozimas (LYG2), avidina (AVD), IRG1, MDV1, genes mitocondriales que codifican fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, NADH deshidrogenasa subunidad 4, concavalina A, factor de mantenimiento de la latencia (LMF) actúan durante el proceso de defensa contra el virus y los efectos citopáticos sobre las células hospederas (18, 55, 56).

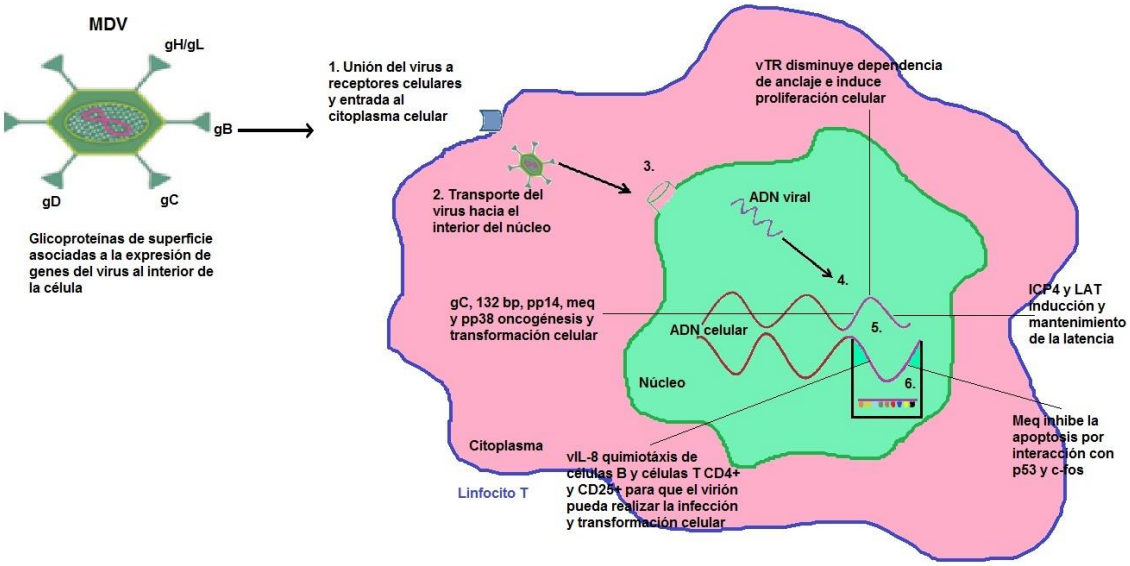

Figura 2: Genes virales asociados al desarrollo de linfomas y a evasión de la respuesta inmune contra el virus: El virus de la enfermedad de Marek entra a la célula y es transportado al núcleo en donde el genoma viral se une al genoma celular en las zonas episomales de los cromosomas (pasos 1, 2 ,3 y 4) 5. Representa la transcripción del DNA viral, 6. Representa los genes virales gC, 132 bp, pp38, pp14, Meq, ICP4, vIL-8, LAT y vTR, estos genes están involucrados en los cambios morfológicos de los linfocitos T, la oncogénesis viral y la latencia viral

La hipótesis por la cual algunos de los genes activados generan resistencia a la EM en las aves se debe a: 1) la expresión de los genes puede causar pérdida de la capacidad receptor del VEM para unirse a las células; 2) Las células NK ayudan a eliminar las células infectadas, 3) afectar el ciclo de vida del virus y 4) prevenir la transformación de células infectadas (23, 24, 27).

Los genes asociados a susceptibilidad a la EM tales como: IgG-H, Beta defensinas (AvBD1, AvBD2 y AvBD4), genes de matriz de metaloproteínas (MMP2, MMP7 y MMP13), lectinas y colectinas (CLEC3B, COLEC10 y COLEC12), receptores de

quimoquinas (CCR6), moléculas de adhesión AMIGO2, moléculas de superficie de células dendríticas [TIM4 (molécula estimuladora de células Th2)], Colágeno tipo XII (COLI2A1 y SLC40A1), reguladores de apoptosis, genes involucrados en a formación y mantenimiento de uniones apretadas requeridas para el contacto célula-célula (23) afectan vías de señalización de la respuesta inmune innata para tales como: Interacción citoquina-receptor, receptores TLRs, vías de señalización JAK-STAT como mecanismo de evasión de la respuesta inmune y una mejor capacidad del virus para causar lesiones, las líneas de aves con mayor susceptibilidad al VEM son las líneas de aves provenientes directamente de los cruces realizados con la estirpe Leghorn (27).

La mayor asociación entre la resistencia genética a la enfermedad está dada por la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); donde las gallinas con los haplotipos B1, B4, B5, B12, B13, B15 y B19 del CMH son altamente susceptibles a los tumores, (51) gallinas con haplotipos B6 y B14 tienen moderada resistencia a VEM y las aves con haplotipos B2, BQ y B21 del CMH son muy resistentes (23, 25, 49, 51, 56).

5.10. Conclusión

El VEM tiene gran importancia en la industria avícola debido a que no solamente presenta enfermedad clínica en las aves, sino que repercute en la susceptibilidad de las aves a la presentación de enfermedad por otros agentes infecciosos debido a la inmunodepresión inducida por el virus; la infección del virus a las células del sistema inmune afecta tanto su número como su capacidad de responder a los antígenos circundantes. Adicional a su condición de latencia en el huésped, el mecanismo de la modificación/mutación del genoma del VEM resaltan su patogénesis, garantizándole su replicación, excreción y diseminación entre los lotes de aves.

En la replicación del virus intervienen componentes celulares que hacen que el virus cambie sus características de patogenicidad y adquiera mecanismos que garantizan su supervivencia por mucho tiempo en el hospedero, es el caso de la latencia para poder reactivarse el virus necesita de cambios intracelulares para causar enfermedad clínica, mecanismo que hace importante a este agente, debido a que no se ha controlado esta capacidad del virus para permanecer en la célula y causar daños.

El VEM ha llevado a que se estudie ampliamente durante el desarrollo de las diferentes líneas genéticas, ya que estas tienen características que las pueden hacer susceptibles o resistentes al agente y no pueden desarrollar una respuesta productiva para evitar los signos clínicos y las pérdidas económicas que genera la enfermedad en el mundo, por esto se han creado muchos grupos en el mundo dedicados a investigar sobre las diversas características genómicas del virus y cómo las aves pueden responder de manera más eficaz y entender mejor la respuesta adaptativa del sistema inmune frente al agente.

6. Capítulo 2:

Evaluación de la fosfoproteína pp38 y meq en tejidos infectados por el virus de la enfermedad de Marek por Inmunohistoquímica

El virus de la enfermedad de Marek causa una enfermedad linfoproliferativa en órganos viscerales y también una forma neurológica, usualmente las aves se pueden infectar debido a la inhalación de partículas virales presentes en el ambiente, el virus ingresa vía respiratoria e inicia el proceso de replicación en órganos linfoides y después la transformación celular; las células transformadas pueden expresar algunos antígenos virales como la fosfoproteína pp38, los cuales son usados para el diagnóstico de la EM (103).

Las partículas y antígenos del VEM se han detectado en células epiteliales del folículo plumoso, túbulos renales y linfocitos de la bursa de Fabricio (49), pp38 es necesaria para la infección citolítica de células linfoides y mantenimiento de la transformación celular ya que previene la apoptosis (36)

6.1. Introducción a la Inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica (IHQ) o Inmunocitoquímica es un método utilizado para localizar antígenos específicos virales en células o tejidos basado en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, es importante porque demuestra la especificidad provista por la unión de un anticuerpo con un antígeno a nivel de ser visto por medio del microscopio de luz. (58)

El principio crítico básico de la IHQ es, como cualquier otro método especial de coloración, es la localización nítida de los componentes blanco en las células y tejidos basado en una relación señal/ruido satisfactoria. (58)

Un anticuerpo es una molécula que tiene la propiedad de combinar específicamente con una segunda molécula llamada antígeno. La producción de anticuerpos por un animal es inducida específicamente por la presencia de un antígeno, esto forma parte de la respuesta inmune básica (58)

El reconocimiento antígeno-anticuerpo está basado sobre la estructura tridimensional de la proteína (u otro antígeno) el cual es una cuestión crítica en la no entendida efectividad de la IHQ (particularmente después de la modificación en la conformación de proteínas inducida por la formalina) (58)

La evaluación de un anticuerpo para ser usado en IHQ está basada en dos puntos, la sensibilidad y especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. El desarrollo de las técnicas de hibridoma proporciona casi limitados recursos de anticuerpos altamente específicos. (58)

Los anticuerpos monoclonales no garantizan especificidad de antígenos desde los diferentes antígenos que pueden mostrar epítopes similares o con la reacción cruzada, la especificidad práctica reflejada en la IHQ es excelente para muchas pruebas con anticuerpos monoclonales. (58)

Un anticuerpo policlonal es un antisuero el cual contiene diferentes especies moleculares de anticuerpos con afinidades variables e inclusive especificidades variables contra diferentes antígenos o determinantes antigénicos usados para

inmunizar animales (58). Los anticuerpos policlonales pueden dar un trasfondo no específico de coloración a las placas (58)

La IHQ es una de las técnicas más utilizadas en patología quirúrgica. Ha tenido un interés creciente en el uso de anticuerpos específicos para antígenos virales, bacterianos, fúngicos y parasitarios en la detección e identificación de agentes causales de muchas enfermedades infecciosas. Las ventajas de la IHQ para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas son (58)

- Permite resultados rápidos
- Puede ser realizada sobre tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina reduciendo el riesgo de exposición a enfermedades infecciosas serias.
- Alta sensibilidad permitiendo la identificación de agentes infecciosos inclusive antes de que los cambios morfológicos ocurran.
- Útil para el diagnóstico retrospectivo de pacientes individuales y para estudiar con profundidad la enfermedad.
- Especificidad: anticuerpos monoclonales y algunos anticuerpos policlonales que permiten la identificación específica de agentes infecciosos.

La IHQ tiene un importante papel no solamente en el diagnóstico de un amplio número de infecciones virales, sino en el estudio de su patogénesis y epidemiología. Tradicionalmente el diagnóstico de infecciones virales se ha direccionado sobre los cambios citopáticos observados sobre la histología de rutina (58).

La activación de un limitado número de genes virales en las lesiones de piel en la enfermedad de Marek (EM) ha sido demostradas anteriormente por (82), la única fosfoproteína 38 (pp38) del virus de la enfermedad de Marek (VEM) que podría tener papel en la infección citolítica temprana en linfocitos y el mantenimiento de su

transformación fue mostrada ser altamente expresada en lesiones cutáneas experimentalmente inducidas (59).

El antígeno temprano viral pp38, es una de las 3 fosfoproteínas antigénicas tempranas, es expresada en el citoplasma de células líticamente infectadas y en una gran proporción de células transformadas y podría ser buen indicador de la infección citolítica. La mayor expresión de pp38 se presenta en linfocitos y en el tejido linfoide puede representar una mejor eficiencia en la replicación viral y la diseminación está asociada con la susceptibilidad a la EM (90).

A mediados de 1980, pp38 fue solamente el único antígeno específico detectado y relacionado con tumorigénesis en aves infectadas con el VEM. El papel central de pp38 en la transformación celular fue debatido desde que los genes de pp38 también se expresaron por cepas vacunales no oncogénicas como en la cepa CVI988 (92, 93).

Este estudio inmunohistoquímico fue realizado con el fin de encontrar evidencia de la presencia de las proteínas pp38 y meq en muestras positivas al VEM diagnósticadas por histopatología y corroborar el diagnóstico de EM realizado por histopatología, con las cuales se pretendió identificar que estos casos se presentaron por cepas oncogénicas del VEM, con este tipo de estudios, se pretendió demostrar la presencia de la fosfoproteína pp38 y meq en hígado y bazo lo cual indicaría fases citolíticas del virus y presencia de virus patogénicos.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Muestras

Las muestras utilizadas para la Inmunohistoquímica fueron entregadas por el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) las cuales representaron muestras positivas a la EM diagnosticadas por histopatología durante el 2002 y 2012. Estas muestras pertenecían a especímenes enviados de varios lugares de Colombia (Norte de Antioquia, Sabana de Bogotá, Mesa de los Santos y Buga), se obtuvieron 56 muestras, las cuáles fueron órganos embebidos en parafina colectados de diversas avícolas comerciales en Colombia, de las cuales 12 fueron de gallina ponedora y 44 de pollo de engorde.

6.2.2. Histopatología

Las muestras fueron enviadas al laboratorio en formalina buferada al 10% y procesadas durante las 24 a 48 horas posterior a su llegada. Dichas muestras fueron embebidas en parafina, cortadas a 4um y coloreadas con Hematoxilina y Eosina para luego ser analizadas por medio del microscopio óptico a un aumento de 40X.

6.2.3. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales H19 y T65 específicos para determinar la presencia de la fosfoporteína pp38 en tejidos y 23B46 específicos para determinar la oncoproteína meq del VEM en los tejidos estudiados fueron provistos por el Dr. Aly M Fadly del Departamento de Agricultura de Estados Unidos USDA

6.2.4. Inmunohistoquímica

A las muestras embebidas en parafina (bloques) se les realizaron tres cortes seriados de 5um cada uno y los tejidos cortados se pusieron sobre láminas de vidrio para Inmunohistoquímica silanizados DAKO ChemMateTM. La tinción inmunohistoquímica se realizó manualmente con cada uno con anticuerpos monoclonales H19 a concentración de 1:3200 y T65 y 23B46 a concentración de 1:2000 usando Vectastain Avidina-Biotina-Peroxidasa ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado (incluido en el kit) (94).

El protocolo aplicado fue el siguiente:

Las muestras fueron desparafinadas mediante inmersiones en xilol e hidratadas con concentraciones de alcoholes hasta terminar con agua destilada, las muestras se mantuvieron en agua destilada a temperatura ambiente, luego se colocaron sobre un portaobjetos y también los controles correspondientes en la rejilla de tinción en donde se realizó el proceso de coloración así:

Primero re realizó un labado con PBS durante 3 minutos, se incubó con el anticuerpo primario durante 20 minutos, a continuación se realizó un lavado con PBS durante 4 minutos, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado durante 20 minutos, se realizó el lavado con PBS durante 20 minutos, la muestra sebloqueó con peroxidasa durante 7 minutos y medio en inmersión, se lavó con PBS durante 2 minutos y 45 segundos, después se realizó la conjugación con estreptavidina – peroxidasa durante 25 minutos, se lavó con PBS durante 4 minutos, la muestra se incubó con DAB durante 5 minutos, se lavó con PBS durante 2 minutos y 15 segundos, incubación con el cromógeno durante 5 minutos, se lavó con PBS durante 1 minuto y 50 segundos, se realizó la contratinción con hematoxilina durante 1 minuto y 45 segundos, se lavó con

PBS durante 4 minutos y 50 segundos y al final se lavó con agua destilada durante 1 minuto y 30 segundos (94)

La reacción de inmunohistoquímica fue visualizada después de la incubación con una solución de peróxido de hidrógeno y 3, 3'-Diaminobenzimida (DBA) (Vector SK - 4100, Vector Laboratories) durante 7 minutos. Todas las secciones fueron también coloreadas con Hematóxilina de Gill's NO2 (Fisher Scentific, Fair Lawn, NJ) deshidratada y montada en DPX mountant (BDH Laboratory Supplier). (57)

La valoración de los resultados inmunohistoquímicos se hizo midiendo la expresión de pp38 en las células observadas y se valoró de 0 a 3 (+):
0: ausencia de tinción
1 (+): débil tinción
2 (+): moderada tinción
3 (+): tinción fuerte

Posteriormente se realizó una estimación del porcentaje de células positivas para cada intensidad en 10 campos de aumento 40X. Se multiplicó el porcentaje de células que presentaba cada intensidad de tinción, y el resultado se sumó obteniendo un valor que oscilaba de 0 a 300, finalmente, se consideró:

Negativo: 0 a 100
Positivo: 101 a 300

La información fue analizada usando la correlación de Pearson para demostrar la relación entre los órganos estudiados y la presencia de las proteínas pp38 y meq y correlacionarlas según las diferentes especies que fueron afectadas, el grado de afectación, el órgano afectado, la zona geográfica y el año de presentación.

6.3. Resultados

Se analizaron 56 muestras de casos positivos diagnosticados por histopatología desde el año 2002 hasta el 2012, las muestras fueron de granjas de pollos y gallinas ponedoras con lesiones compatibles con la EM, se hizo una revisión de los casos para comprobar por medio de la prueba de inmunohistoquímica la presencia de proteínas virales las cuales confirmarían la presencia del virus en los tejidos analizados, en las muestras estudiadas se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de la presencia de la proteína pp38 y Meq en todas las muestras, no se observó la proteína Meq en ninguna de las muestras analizadas.

En 17 de las 56 muestras se observó la presencia de la fosfoproteína pp38, esto representa un 30,4% de las muestras (Tabla 1).

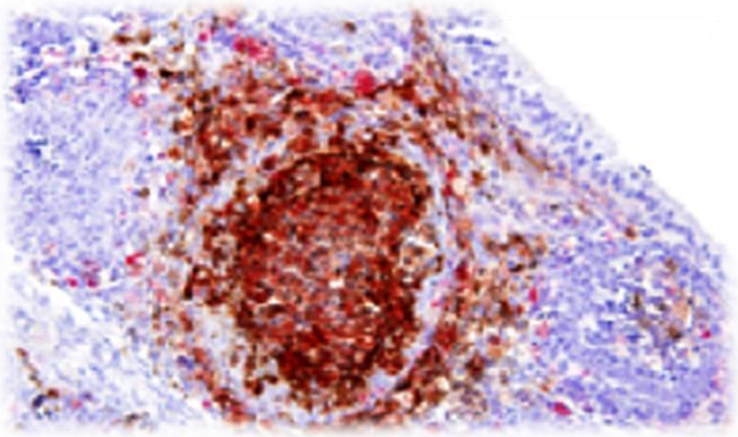

Figura 3: Tinción con anticuerpos para pp38 en Timo de pollo de engorde infectado con el virus de la enfermedad de Marek en Santander – Colombia en 2008

Tabla 1: Resultados de la prueba de inmunohistoquímica para pp38 según el año, órgano, tipo de ave de corral y grado de expresión de pp38

Año	Órgano	Tipo ave	pp38 IHC	pp38 (+)	pp38 cont
2002	Bazo	Pollo	Pos	2+	198
2002	Nervio Ciático	Pollo	Pos	2+	211
2002	Nervio Ciático	Gallina Ponedora	Pos	2+	195
2003	Nervio Ciático	Pollo	Pos	1+	124
2004	Hígado	Gallina Ponedora	Pos	1+	145
2005	Nervio Ciático	Pollo	Pos	3+	256
2006	Bazo	Pollo	Pos	2+	207
2008	Hígado	Pollo	Pos	2+	197
2008	Bazo	Pollo	Pos	2+	218
2008	Timo	Pollo	Pos	2+	235
2009	Bazo	Pollo	Pos	2+	185
2009	Hígado	Pollo	Pos	1+	119
2009	Bazo	Pollo	Pos	1+	130
2009	Bazo	Pollo	Pos	2+	170
2010	Hígado	Pollo	Pos	3+	271
2010	Bazo	Pollo	Pos	2+	207
2012	Bazo	Pollo	Pos	2+	173

De las muestras positivas, 15 pertenecían a pollos de engorde (4 Norte de Antioquia, 7 Mesa de los Santos y 4 en Buga) y 2 a gallinas ponedoras (1 Sabana de Bogotá y 1 en Buga); la mayor presentación de la enfermedad según lo reportado fue entre los años 2008 hasta 2010 (54%) de los casos.

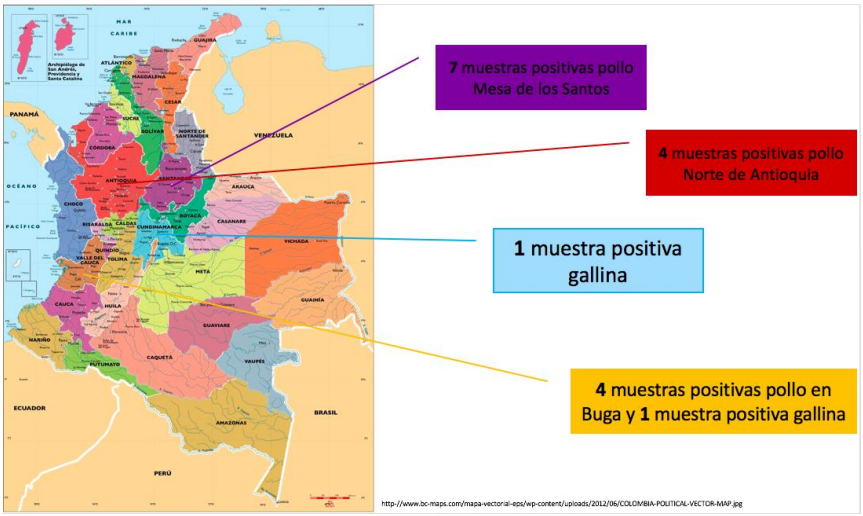

Figura 4: Distribución geográfica de las muestras positivas por IHC para el virus de la enfermedad de Marek en Colombia entre 2002 y 2012

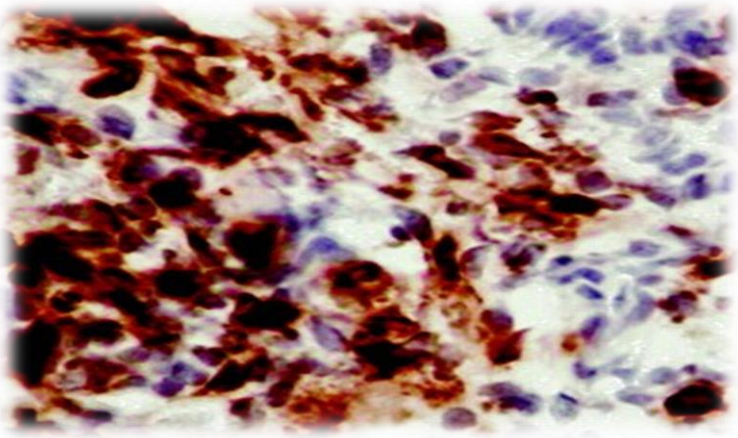

Figura 5: Tinción con anticuerpos para pp38 en Hígado de gallina ponedora infectada con el virus de la enfermedad de Marek en Cundinamarca – Colombia en 2004

La proteína pp38 se encontró en todos los órganos estudiados y hubo mayor presentación en bazo (47% de las muestras positivas), el 23,5% se presentó en nervio

ciático, 23,5 % en hígado y 5,9% en timo, con respecto a las especies afectadas el 88,2% fue en pollos de engorde y el 11,8% fue en gallinas ponedoras.

El 100% de las muestras dieron positivas para el conteo celular según la intensidad de expresión de la proteína pp38. Según la clasificación de las lesiones, el 23,5% tuvo puntaje de 1+, el 64,7% 2+ y el 11,8% 3+.

6.4. Discusión

La prueba de inmunohistoquímica fue utilizada para corroborar la presencia de proteínas virales en las muestras analizadas por histopatología durante 2002 y 2012 en casos positivos para la EM.

Las muestras obtenidas del laboratorio de diagnóstico veterinario del ICA, correspondían con diagnósticos histopatológicos positivos a la enfermedad de Marek.

Sin embargo, en la prueba de inmunohistoquímica solo se determinó la presencia de la proteína pp38, la cual es representativa en la patogénesis viral en la fase citolítica temprana; no en todos los casos de la enfermedad de Marek donde se encuentren hallazgos histopatológicos y/o presentación clínica del virus siempre están involucradas estas proteínas, debemos tener en cuenta que el virus puede tener otras presentaciones clínicas además de la presentación oncogénica, otras de las presentaciones pueden ser: problemas de parálisis de las extremidades debido a infiltración linfocitaria en el nervio ciático, problemas cutáneos, iridociclitis y linfomas en órganos viscerales (101), por esta razón al momento de realizar la evaluación histopatológica de los órganos estudiados se puede encontrar infiltración linfocitaria compatible con la EM y corroborarla con la prueba de inmunohistoquímica.

En las muestras en las que aparece la expresión de la proteína pp38 como evidencia de la presencia de las proteínas virales cabe anotar que no en todos los casos se presentó enfermedad neoplásica en las aves afectadas (sólo el 25% de las aves analizadas en el periodo de estudio presentaron lesiones neoplásicas), la proteína pp38 se encontró en muestras de hígado, bazo, nervio ciático y timo lo que demuestra que en los órganos linfoides se puede encontrar la presencia del virus debido a que infecta linfocitos que pueden migrar hacia esos órganos. Muchas células pueden expresar pp38 durante la respuesta inflamatoria temprana y los productos de la expresión génica de pp38 son importantes en la inducción de la respuesta inmunológica contra el VEM.

La proteína pp38 es una indicación de infección citolítica temprana. Para este estudio también se analizó la presencia de otra proteína importante en el desarrollo oncogénico de las lesiones, meq otra proteína de origen viral, la cual es una oncoproteína y es expresada en estados tardíos de la enfermedad no se encontró las muestras analizadas, esto puede ser porque esta se expresa en la infección citolítica tardía (transformación celular) luego del estado de latencia viral; a diferencia de la fosfoproteína pp38 que se expresa en estados tempranos de la infección y en el proceso de activación de la latencia viral (88, 89).

La fosfoproteína pp38 tiene un papel importante en la infección citolítica temprana de los linfocitos y el mantenimiento de la transformación celular (82), lo que puede indicar que la presencia de esta proteína se da en la replicación temprana del virus y la respuesta inflamatoria temprana (104)

El desarrollo de la infección latente en linfocitos T es un prerrequisito para la transformación maligna y la enfermedad neoplásica en las aves infectadas. La demostración de la presencia en el bazo de una mayor cantidad de muestras positivas a la proteína pp38 en las muestras estudiadas, indican que en este órgano linfoide se

puede dar una mayor capacidad de replicación del virus y que desde allí se genere una mejor diseminación del virus a otros órganos debido a la importancia que tiene este como órgano linfoide, esto también está relacionado con la alta susceptibilidad de las aves a la EM según lo reportado por (74).

La presencia de la fosfoproteína pp38 en los tejidos no significa que en los tejidos analizados por histopatología se presenten cambios neoplásicos que indiquen claramente casos compatibles con la EM, ya que esta fosfoproteína es un indicador de los inicios de la replicación viral en las células y de los primeros cambios celulares o las fases inflamatorias de la enfermedad, en fases posteriores de las signología clínica se podría encontrar otras proteínas oncogénicas (87).

La expresión de pp38 es otro indicativo en las aves de una inmunodepresión debido a que la expresión de esta causa disminución de la expresión en los linfocitos afectados del MHC en las células infectadas en el Bazo.

Los cambios presentados en los tejidos infectados con el virus de la Enfermedad de Marek muestran un patrón de expresión de la proteína pp38 como principal indicador de patogenicidad asociada al virus en las muestras estudiadas, sin embargo, en 8 muestras analizadas no se demostró la presencia de tumores de tipo linfoide como principal hallazgo, tanto en la forma clásica de la enfermad, como en la forma aguda, la enfermedad comienza con la proliferación de células linfoides en los órganos, al diagnóstico histopatológico, algunas lesiones pueden consistir en una infiltración de linfoblastos proliferativos, de linfocitos grandes, medianos y pequeños, y de macrófagos,las cuales parecen ser de naturaleza neoplásica; otras lesiones se caracterizan por un edema interneurítico, una infiltración de linfocitos mayoritariamente pequeños y células plasmáticas, y por la proliferación de células de Schwann, y parecen ser inflamatorias; el último tipo de lesiones consisten en una leve dispersión de

linfocitos principalmente pequeños, y a menudo aparecen en aves que no presentan lesiones macroscópicas ni síntomas clínicos. Se considera una lesión inflamatoria regresiva (OIE, 2008 Manual de pruebas diagnósticas y vacunas para animales terrestres). Estas lesiones, son comunmente diagnósticadas como EM, para corroborar la presencia del virus y de lesiones neoplásicas se utilizó el marcador pp38 con lo cual todas las muestras no presentaron evidencia del VEM.

Las muestras positivas para pp38 en las cuales no se demostró por histopatología de cambios neoplásicos en los tejidos es debido a que la pp38 no está involucrada en la tumorigénesis, pero tiene un papel importante en la infección citolítica temprana en los linfocitos (102), por esto, la histopatología es positiva y la prueba de inmunohistoquímica es negativa.

La presencia de proteínas del VEM en las muestras estudiadas nos demuestra la presencia del virus en Colombia, esto es relevante en la producción avícola puesto que es una de las enfermedades que genera un mayor impacto en el decomiso en planta de sacrificio y por su carácter inmunodepresor, puede contribuir al deterioro de la respuesta inmune en las aves afectadas.

En las muestras en las que se obtuvo una mayor cantidad de expresión de la proteína pp38, coincide con ser la zona de mayor cantidad de aves para la producción avícola en Colombia (Santander), es de remarcar que existe una gran cantidad de granjas en esta zona, en pollo de engorde se encontró la mayor incidencia de casos, puesto que la mayoría de las muestras fueron de este tipo de aves y los ciclos productivos son más cortos, la mayor incidencia de estos casos en esta especie puede estar asociada con agentes inmunosupresores asociados (101). En esta zona podría haber una mayor prevalencia del virus, lo que sería conveniente estudiar en futuros proyectos.

6.5. Conclusiones

En esta parte del estudio se puede observar que las muestras embebidas en parafina pueden ser útiles para determinar la presencia de proteínas del VEM.

Durante el tiempo en el cual se presentaron los casos de la EM en Colombia, se observa que hay una variabilidad en el número de casos positivos con respecto al serotipo que puede estar involucrado en la casuística, según los resultados podemos determinar la presencia de un virus oncogénico debido a que la proteína blanco fue pp38 la cual es una proteína que se presenta durante las fases iniciales de la replicación viral y después de la latencia.

Aunque la fosfoproteína pp38 no fue encontrada en todos los tejidos, esto no es indicio de que el VEM no sea el causante de las lesiones, puesto que durante su ciclo viral o patogénesis puede llegar a causar otras lesiones clínicas como la inmunodepresión y por tal motivo otros agentes infecciosos producir lesiones.

La presencia de la fosfoproteína 38 (pp38) se demuestra en las cepas oncogénicas del VEM, algunas cepas vacunales pueden presentar esta proteína debido a los cambios genómicos que se presentan por los diferentes pasajes en cultivo celular para atenuar su virulencia y eso en nuestro caso podría ser una hipótesis para demostrar que las cepas vacunales pueden tener la posibilidad de revertir su virulencia y causar la enfermedad clínica, para lo cual se debe avanzar con este tipo de estudios en muestras de granjas en las cuales se observen signos compatibles con la enfermedad y poder acompañar el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico con diagnóstico molecular.

7. Capítulo 3

Determinación por medio de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa, de la presencia de la fosfoproteína pp38 y la proteína meq en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina

La enfermedad de Marek es una enfermedad linfoproliferativa común en las aves de corral (35). El diagnóstico de la enfermedad de Marek es problemático, debido a que raramente las lesiones inducidas son patognomónicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha emergido como una herramienta de diagnóstico adicional como una ventaja de especificidad de serotipo (105), la PCR tiene la habilidad de diferenciar entre cepas vacunales y de campo del VEM así como los diferentes serotipos (96, 105)

7.1. Introducción Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los alfaherpesvirus tienen una regulación en la expresión de su genoma y en orden de presentación, se han distinguido tres fases de la expresión génica, inmediatamente temprana, temprana y tardía. Sin embargo los Alfaherpesvirus también frecuentemente establecen latencia en la cual un par de genes son expresados. (61)

Algunos métodos basados en PCR para la detección del virus de la enfermedad de Marek (VEM) en el folículo de plumas han sido desarrollados para la vigilancia de VEM porque son muestras convenientes para la colección en campo y el transporte al laboratorio (62)

La preservación de bloques de tejidos tumorales fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE) es un método útil para preservar muestras para el diagnóstico microscópico. Los ácidos nucléicos han sido exitosamente extraídos de tejidos

archivados en FFPE y analizados por transcriptasa reversa PCR (PCR-TR) o PCR cuantitativa (cPCR) para la identificación de enfermedades humanas o de peces. (63)

Otros virus aviares como Newcastle o Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa han sido detectados en tejidos FFPE por PCR-RT e IHC. En un estudio realizado por Cao et al 2013 el tiempo de almacenamiento de tejidos FFPE no afecta la capacidad de detectar pp38 del VEM en tejidos FFPE almacenados por más de 20 años (63).

Los indicadores específicos para pp38 amplifican productos en tejidos infectados y no amplifican en tejidos no infectados o de gallinas vacunadas con vacunas trivalentes contra el VEM (63).

La fijación de tejidos infectados con el VEM en formalina buferada al 10% no afectó la habilidad de amplificar productos de PCR cuando los tejidos fueron almacenados por lo menos 150 días. El uso de tejidos tumorales FFPE es una alternativa útil con la cual se puede identificar la infección contra VEM (63).

La necesidad de acceder a muestras fijadas en formaldehído es muy crítica haciendo el uso de colecciones archivadas altamente importante. Mucho de este material ha sido fijado con otros propósitos limitando su utilidad para estudios de DNA (64).

Muchas veces los resultados de DNA en intentos tempranos fueron generalmente bajos y la conclusión fue que los resultados son ampliamente dependientes del tipo de fijación y el tiempo de almacenamiento (69). Solamente dos décadas atrás la necesidad para archivar colecciones con propósito de DNA ha sido propuesta. El formaldehído es conocido como un potente agente de ligación cruzada de DNA, proteína-DNA y proteína-proteína, la reactividad de la sección libre en la doble cadena de DNA es muy baja, como la reacción de entrecruzamiento puede ser parcialmente rota, ocasionando

éxito limitado con la prueba de PCR y otros experimentos. La fijación en formaldehído degrada el ADN (64)

Algunas de las funciones biológicas del VEM están siendo demostradas al entender cada uno de los genes virales, estos, tienen diferentes funciones luego de comenzar el proceso de replicación viral, un ejemplo de estos es el gen del virus pp38, demostrado que codifica una proteína presente en la patogénesis de la EM. El gen pp38 está asociado a que el virus tenga tropismo linfoide (65), reactivación del estado latente (66, 67), mantenimiento de tumores (68) y la inmunosupresión (69, 70). La expresión *in vitro* e *in vivo* de pp38 en virus recombinantes fue confirmada por inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales T65 que reaccionan específicamente con CVI988/Rispens pp38. (76)

La inmunización con HVT y cepas del serotipo 2 del VEM no previene la infección producida por VEM-1, pero ofrece protección contra signos clínicos de EM, los cuales incluyen inmunosupresión, polineuritis y linfomas de células T en varios órganos y tejidos (12).

La fosfoproteína pp38 de longitud completa (ya sea virus mutante o de campo) es esencial para la replicación viral temprana y el desarrollo rápido de tumores en aves infectadas con cepas de patotipos muy virulentos plus, cuando pp38 se expresa durante los primeros 3 y 7 días post infección marca el final de la infección citolítica (85).

El diagnóstico de la EM es problemático porque la patología inducida es raramente patognomónica. En años recientes la prueba de PCR emergió como una herramienta adicional de diagnóstico ofreciendo ventajas para la identificación de los serotipos. La prueba de PCR tiene la capacidad de diferenciar entre las cepas del VEM vacunales y de campo. (81, 86)

Las cepas de campo se diferencian de las cepas vacunales, porque estas últimas no poseen la expresión de la fosfoproteína pp38 y la oncoproteína meq (86).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de los genes pp38 y meq en las muestras que habían sido previamente diagnosticadas como positivas para la presencia del VEM por histopatología para así determinar la presencia de virus de campo en las aves que presentaron signos clínicos de la enfermedad.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Extracción de DNA

Las muestras se obtuvieron de casos diagnosticados positivos por histopatología y usadas en la prueba de inmunohistoquímica descrita en el Capítulo 2, 56 muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo de Qiagen DNA Blood Mini Kit Cat # 51104 para muestras de tejidos embebidos en parafina. Las muestras en parafina fueron cortadas en secciones de 10 micrones y puestas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, la parafina fue removida usando xileno seguido de etanol y también incubado el precipitado de tejido a 37°C por 45 minutos. El precipitado fue resuspendido en 180 ul de buffer AL. Se hizo digestión con Proteinasa K usando 100 ul de 20 mg/ml de Prot K (Bioshop), 10 ul de Tween 20 (Sigma) en 2 ml de buffer TE a pH 8.

Para cada 20 ul de la solución fue agregada a cada muestra e incubada a 56°C durante 3 horas. La digestión de RNAsa fue realizada usando 4 ul de RNAsa 100mg/ml (Thermo Fisher, Mississauga, ON, Canada) y fueron incubadas a 70°C por 10 minutos. Las muestras fueron puestas en un tubo “spin column” como recomiendan las instrucciones para el protocolo de tejidos.

El volumen final de la muestra fue de 50 ul de buffer AE incluido en el kit. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Cuantificación de DNA: Esta medición se realizó mediante la utilización de un espectofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) a un radio de longitud de onda de 260/280 (95)

7.2.2. Primers o Iniciadores

Primers para PCR: Los primers utilizados para la identificación de los genes virales pp38, meq y gen de la región no codificante del virus HVT fueron:

Gen	Primer	Tamaño amplicón
pp38 (vacuna)	F: GTGATGGGAAGGCGATAGAA	225 pb
	R: TCCGCATATGTTCCTCCTTC	
pp38 VEM Campo	F: TCATCTTCAACCCACAGCCATCC	1006 pb
	R: TCGCTTAATCTCCGCCTCCAAC	
Región nocodificante HVT	F: CGGGCCTTACGTTTCACCT	62 pb
	R: GCGCCGAAAAGCTAGAAAAG	
Meq	F: ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCGGCGCT	1062 pb (serot 1)
	R: GGGGCATAGACGATGTGCTGCTGAG	1240 pb (vacuna)

Tabla 2: Primers usados para determinar la presencia de los genes pp38, región no codificante de HVT y meq (35, 95)

7.2.3. **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La PCR fue realizada con los primers mencionados anteriormente de acuerdo a los protocolos descritos en la metodología. Se utilizaron 10 uM del iniciador, 12.5 ul Master Mix Cat# M7502 (Promega), 5 ul de muestra de DNA para un volumen final de 25 ul.

Condiciones de la PCR:

Según los diferentes genes estudiados, las condiciones de la PCR fueron: para el gen MDV se realizó 1 ciclo de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 51°C por 40 seg y 72°C por 30 seg, seguido por 1 ciclo a 72°C por 8 min. Para la amplificación del gen pp38 se realizó 1 ciclo de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 20 seg, y 72°C por 90 seg, seguido por 1 ciclo a 72°C por 8 min. Para el gen HVT se realizó 1 ciclo de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 59°C por 30 seg, y 72°C por 30 seg, seguido por 1 ciclo a 72°C por 5 min y para el gen MEQ fue 1 ciclo, 95 C 5 min seguido por 40 ciclos de 94 C por 1 min, 57 C por 1 min, and 72 C por 1 min seguido por 1 ciclo at 72 C por 8 min. Se utilizó un termociclador Techne para amplificar las muestras (35, 95).

7.2.4. **Visualización de los productos de la prueba de PCR**

Los productos fueron analizados en un equipo (Mini-Sub® Cell GT Horizontal Electrophoresis System, BioRad, Mississauga, ON, Canadá) por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE 1X a 120V por 90 minutos y los productos fueron visualizados por coloración con bromuro de ethidio.

7.2.5. Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados por la correlación de Pearson para determinar la presencia del fragmento genómico del virus según los órganos estudiados y el año en que se obtuvieron, para determinar la correlación entre el órgano con presencia del genoma viral se tuvo en cuenta la cantidad de órganos del mismo tipo con respecto a la cantidad de potitivos a los genes pp38, HVT y VEM y poder determinar el lugar probable de replicación del virus.

7.3. Resultados

Se evaluó la presencia de copias de ADN del VEM en muestras obtenidas de muestras positivas a histopatología y puestas en bloques de parafina (linfomas EM, tejidos latentemente infectados por VEM, linfomas en aves vacunadas contra el VEM y los tejidos no infectados).

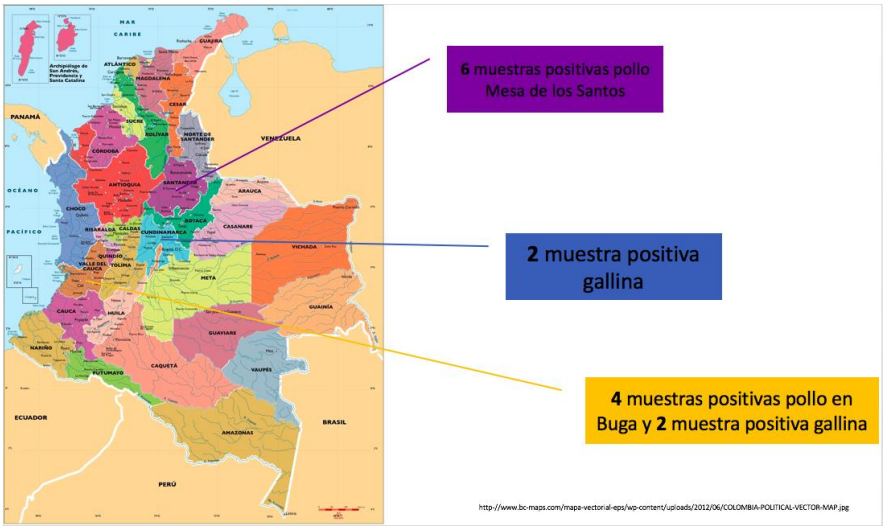

Figura 6: Distribución geográfica de las muestras positivas por PCR para el virus de la enfermedad de Marek en Colombia entre 2002 y 2012

En la siguiente tabla se observa el porcentaje en el cual se encontraron los genes evaluados según el año en que se presentó el caso y fueron obtenidas las muestras de las granjas en las zonas de Antioquia, Valle del Cauca, Cundinamarca y Santander.

	VEM	Porcentaje año	pp38	Porcentaje año	Meq	Porcentaje año	HVT	Porcentaje año
2002	2	3,6	2	3,6	0	0,0	4	7,1
2003	1	1,8	2	3,6	0	0,0	2	3,6
2004	2	3,6	0	0,0	0	0,0	2	3,6
2005	1	1,8	1	1,8	0	0,0	2	3,6
2006	0	0,0	1	1,8	0	0,0	0	0,0
2007	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	7,1
2008	1	1,8	3	5,4	0	0,0	4	7,1
2009	0	0,0	2	3,6	0	0,0	4	7,1
2010	2	3,6	4	7,1	0	0,0	8	14,3
2011	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
2012	0	0,0	1	1,8	0	0,0	0	0,0

Tabla 3: Resultados de la PCR para los genes VEM**, pp38, Meq y Herpesvirus de Pavo (HVT) por año, el porcentaje de positividad es tomado sobre el total de las aves positivas a la prueba reliazada.**

Se muestra como en los años evaluados no se encontró presencia del gen Meq en ninguna de las muestras evaluadas, el mayor porcentaje de muestras positivas se encontró en las evaluaciones realizadas a las cepas HVT o Herpesvirus de Pavo, se pudo relacionar que las muestras positivas a pp38 estaban asociadas a la presencia de daños tumorales en las aves.

En las imágenes se muestra la amplificación de los genes estudiados en las muestras analizadas por PCR, se aprecia la presencia de los genes pp38 de la cepa vacunal CVI 988 (1006 pb) y de la cepa de campo VEM (225 pb) y del virus vacunal HVT (62 pb).

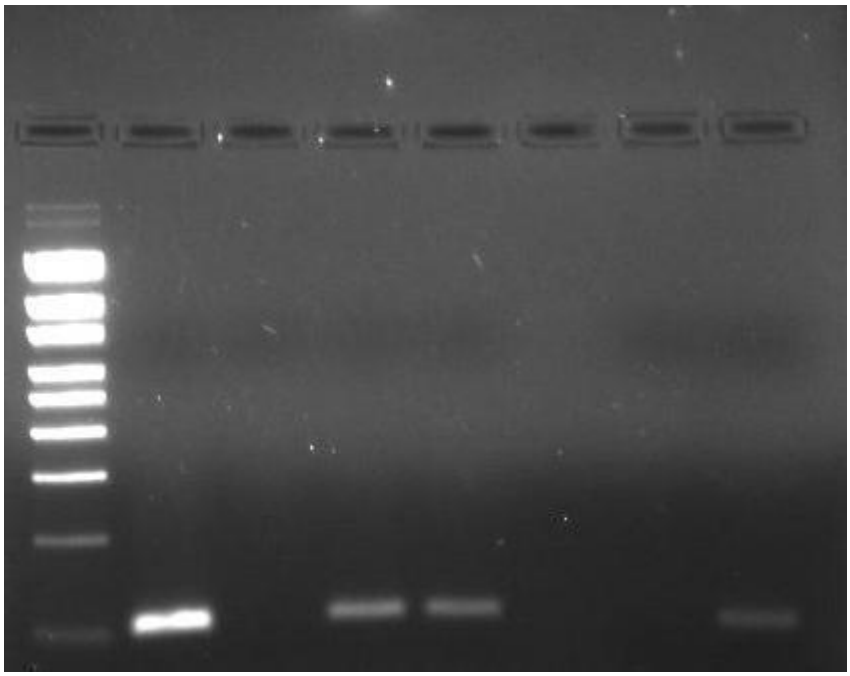

Figura 7. Amplificación del gen HVT de 62 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la segunda columna se demuestra el control positivo, en las columnas 3, 4 y 8 la amplificación del gen en muestras positivas al virus de la enfermedad de Marek

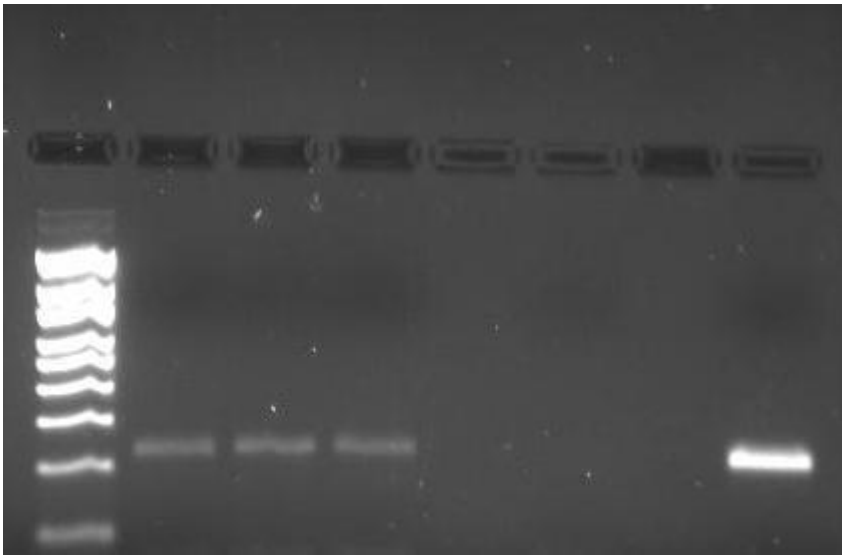

Figura 8. Amplificación del gen VEM**, 225 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la columna 8 se demuestra el control positivo, en las columnas 2, 3 y 4 la amplificación del gen en muestras positivas al virus de la enfermedad de Marek**

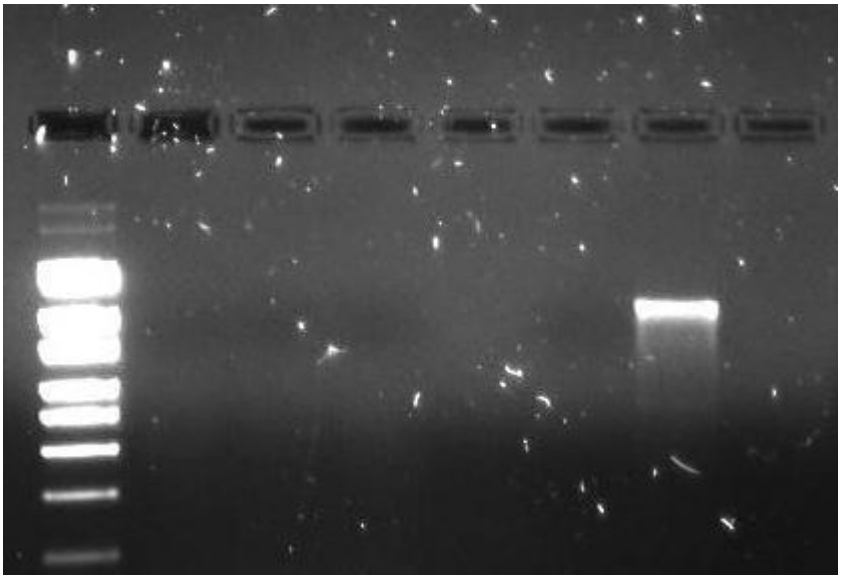

Figura 9. Amplificación del gen pp38, se observa una banda de 1006 pb, a la izquieda se encuentan los marcadores de peso molecular, en la columna 8 la amplificación del gen en muestra positiva al virus de la enfermedad de Marek

Por medio de la prueba de correlación de Pearson y los resultados presentados en las trablas 5 y 6 se realizó la correlación entre las variables estudiadas y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Correlación entre la presencia de los diferentes genes amplificados por PCR y su presencia en los órganos estudiados.

Variables	Correlación
Bazo PCR pp38	-0,359738467
Bazo PCR HVT	0,007850687
Bazo PCR VEM	-0,286077251
Hígado PCR pp38	-0,050507627
Hígado PCR HVT	-0,223606798
Hígado PCR VEM	0,538027587

Se puede observar como existe una correlación negativa ante la presencia del gen de la cepa HVT en el Bazo de las aves que fueron positivas para PCR debido a que en este órgano ocurre la llegada del virus. En las muestras de hígado existe una correlación positiva entre VEM y las lesiones, esto se relaciona con que ésta es una cepa de campo que puede estar afectando a las aves.

Los resultados de la tabla 4 muestran el índice de correlación de la presencia de genes del VEM en Hígado y Bazo

La correlación indica que en el órgano donde se encontró la presencia de los genes involucrados en la patogénesis del virus son órganos linfoides de las aves y no están involucrados en los signos clínicos de la enfermedad, ya que el virus se puede encontrar en latencia en el hígado, ya que en este órgano se presentan la mayor cantidad de signos clínicos de la enfermedad, mientras que en el bazo, se presentan genes de virus, principalmente de origen vacunal. (90)

Tabla 5: Cantidad de muestra con presencia de los genes pp38, MDV, HVT y positivas a pp38 por inmunohistoquímica según el tipo de órgano y la zona donde se presentaron los signos clínicos

Parámetro	Pos PCR MDV	Pos PCR PP38	Pos PCR HVT	Pos IHC pp38
	9	**16**	**30**	**17**
Gallina ponedora	**3**	**4**	**5**	**2**
Bazo	1	1		
Sabana de Bogotá	1	1		
Hígado	1	2	3	1
Buga	1	2	3	1
Nervio ciático	1	1	2	1
Sabana de Bogotá	1	1	2	1
Pollo	**6**	**12**	**25**	**15**
Bazo	3	4	8	8
Buga	2	3	4	4
Mesa de los santos	1	1	3	2
Norte de Antioquia			1	2
Hígado		3	9	3
Mesa de los santos		3	8	3
Norte de Antioquia			1	
Nervio ciático	2	4	4	3
Buga		1	1	
Mesa de los santos		1	2	1
Norte de Antioquia	2	2	1	2
Timo	1	1	4	1
Buga	1		2	
Mesa de los santos		1	2	1
Total general	**9**	**16**	**30**	**17**

La tabla 5 muestra la distribución de las muestras según los diferentes órganos evaluados y el lugar en donde se presentó el brote, en 16 de las muestras evaluadas se encontró la expresión por PCR del gen pp38, esto muestra que fueron infecciones de virus diferentes a los vacunales, además fue una mayor expresión en pollo de engorde

que en gallina ponedora, órganos como el nervio ciático y el bazo presentaron mayor cantidad de la expresión del gen, lo que en el análisis histopatológico demostró que había un mayor infliltrado linfocitario en estos órganos con respecto a los demás, consecuente con esto, en el bazo se presentó una mayor cantidad de la proteína pp38 por IHC lo que demuestra que allí se presentó mayor expresión de esta proteína importante en el proceso de replicación y patogénesis viral.

Tabla 6: Cantidad de muestras con presencia de los genes pp38, MDV, HVT y positivas a pp38 por inmunohistoquímica según la especie afectada y el año en el cual se presentaron los signos clínicos

Parámetro	Pos PCR MDV	Pos PCR PP38	Pos PCR HVT	Pos IHC pp38
Gallina ponedora	**3**	**4**	**5**	**2**
Buga	**1**	**2**	**3**	**1**
2002			1	
2004		1		
2008	1		1	1
2010		1	1	
Sabana de Bogotá	**2**	**2**	**2**	**1**
2002	1	1		
2005	1		1	1
2009		1	1	
Pollo	**6**	**12**	**25**	**15**
Buga	**3**	**4**	**7**	**4**
2003			1	
2005	1	1	2	1
2008	1	1	1	
2009			1	
2010	1	2	1	2
2011				1
2012			1	
Mesa de los santos	**1**	**6**	**15**	**7**

En la tabla 6 se muestra la cantidad de muestras que fueron positivas según el año en que se presentó el caso, en 2005 y 2009 se presentó un mayor número de positivos a pp38 por PCR e IHC en pollo de engorde con respecto a los demás años; en gallina ponedora, en 2002 se presentó la mayor cantidad de casos de la enfermedad, distribuida entre la Sábana de Bogotá y Buga.

7.4. **Discusión**

En las muestras analizadas se observa una serie de amplificaciones de fragmentos del genoma viral de cepa de campo y las dos cepas vacunales utilizadas en Colombia para la inmunización de las aves contra la EM. Se han demostrado una serie de expresiones genómicas de diferentes genes del VEM, se analizaron los serotipos 1 y serotipos 3 del virus, para el serotipo 3 se analizó la cepa vacunal HVT y la cepa vacunal CVI988 (Rispens) del serotipo 1 las cuales no se tiene claridad que sean las causantes de las lesiones en los tejidos (98, 100).

La presencia del genoma de pp38 demuestra que hay presencia de virus patogénicos durante el tiempo de estudio de la enfermedad, se observa como en mayor proporción está presente la enfermedad en pollo de engorde que en gallina ponedora, esto posiblemente debido al hecho de que puede haber un mayor estrés por condiciones de manejo y sanitarias de las granjas en las zonas de estudio, lo que puede hacer que haya una mayor recirculación viral.

Las muestras en las cuales hubo amplificación del gen pp38 y no se demostró por histopatología de cambios neoplásicos en los tejidos es debido a que la pp38 no está involucrada en la tumorigénesis, pero tiene un papel importante en la infección citolítica temprana en los linfocitos (102), por esto, la histopatología es positiva y la prueba de

PCR es negativa, en estos casos el virus también puede estar en estado de latencia (98).

Durante los años 2008 y 2010 se presentó en mayor porcentaje de aves en los cuales se detectó el amplicón de pp38, esto concuerda con el mayor número de muestras analizadas en esos años y un mayor reporte de la prevalencia de la enfermedad en Colombia, esto pudo generar que se presentaran cambios en los planes de vacunación de las aves para no verse afectadas durante los años anteriores.

La ausencia de amplicones del gen meq pueden deberse a que los virus encontrados estaban en etapas tempranas de la infección (Infección citolítica temprana) o en fase de latencia y no se habían presentado cambios tumorales en las células de estudio (97)

Existe una correlación negativa entre las amplificaciones genómicas y el órgano (en este caso el bazo), ya que se muestra que en este órgano se encontró la gran mayoría de los genes estudiados, esto debido a que muy posiblemente el virus no estaba en fase de latencia, sino en fase temprana de la infección, lo que demuestra que las aves susceptibles pueden tener una mayor carga viral en este órgano (99). En los tejidos en los cuales se diagnóstico la enfermedad por histopatología se puede o no presentar amplificación del gen pp38, esta amplificación se debe a que en los momentos en donde el virus está en la fase citolítica temprana y comienzos de la transformación celular, este gen comienza a expresarse (101).

Las diferentes formas de presentación de la enfermedad, parálisis transitoria, neoplasias en órganos viscerales, forma cutánea y afectación ocular pueden ser una de las variables por las cuales en campo no se presenten signos patognomónicos de esta, en cualquiera de ellas, al realizar los estudios histopatológicos se puede encontrar

infiltración linfocitaria, sólo en la fase de enfermedad neoplásica se encuentra la fosfoproteína pp38 (99, 101)

Las diferencias en las tasas de desarrollo tumoral combinadas con diferencias significativas en la replicación viral sugieren que el grado de infección puede jugar un papel en el cambio celular al desarrollo tumoral (un amplio número de células infectadas tiene amplio margen de desarrollo tumoral) (95)

El máximo de carga genómica viral en células infectadas con el virus de la Enfermedad de Marek corresponde al momento de la infección citolítica activa, mientras algunos genes pueden no expresarse durante el tiempo de latencia viral, CVI988 entra en latencia en el tejido linfoide alrededor de 7 días post vacunación y es probable que gran cantidad del virus se replique en el bazo durante la fase citolítica y esto estimula mejor la respuesta inmune y el mantenimiento de altos niveles de virus latente no es necesario (96).

La carga genómica en tejido linfoide es alrededor de cien veces más baja para CVI988 que para cepas de mayor virulencia como la RB-1B (98).

En las muestras analizadas, se observó amplificación del gen pp38 en hígado, bazo, nervio ciático y timo, lugares en donde hay presencia de linfocitos ya que son órganos linfoides de las aves, la presencia de este gen está asociada con la presentación de tumores inducidos por el VEM (56, 87). En muestras en pollo de engorde hubo presencia de la proteína pp38 y la expresión del gen pp38, lo que significa que la presencia del VEM es de tipo oncogénico y solamente se puede encontrar en virus del serotipo 1 (56, 76).

En total se analizaron 56 muestras de las cuales 31 fueron muestras de pollo de engorde y 25 de gallina ponedora, en pollo de engorde, 25 muestras fueron positivas para la expresión de los genes del VEM y en gallina ponedora 5 muestras. La presencia de pp38 en pollo de engorde puede estar asociada con la infección citolítica temprana por la alta presencia de linfocitos en los órganos linfoides por su ciclo de vida tan corto comparado con las gallinas ponedoras (92).

Teniendo en cuenta la distribución geográfica de las muestras en las cuales se encontró expresión genómica de los genes estudiados, las regiones de Buga y Sábana de Bogotá mostraron una mayor cantidad de gallinas ponedoras con expresión de pp38, en estas zonas la cantidad de aves de este tipo es significativa con respecto al resto del país y están ubicadas en zonas específicas en donde hay una alta densidad de animales con diferentes condiciones de manejo, bioseguridad y planes de vacunación (Federación Nacional de Avicultores, 2016)

7.5. Conclusiones

Se determinó la presencia del gen pp38 en las muestras estudiadas, lo que correlaciona lo encontrado en la prueba de inmunohistoquímica, ya que fue la proteína que tuvo mayor expresión en las muestras.

No se encontró expresión del gen meq en las muestras estudiadas, esto puede relacionarse con el momento de infección, ya que el gen pp38 se expresa en los momentos iniciales de la infección celular (fase citolítica temprana) y en la latencia y el gen Meq en la fase citolítica tardía, esto concuerda con los análisis histopatológicos realizados a las muestras en donde no se determinó cambios oncogénicos en los órganos estudiados.

Las muestras analizadas mostraron algunos de los casos estudiados positivos a la presencia del VEM y de proteínas como la pp38, que se presenta en la fase temprana de la infección y la fase citolítica de esta (formación de tumores linfoides), esto se presentó en mayor proporción en la zona de Santander y Valle del Cauca, la cual se caracteriza por ser una zona de influencia avícola

Los resultados de la PCR demuestran que el diagnóstico realizado por histopatología es confirmado por la determinación del genoma viral, esto es importante, porque ayuda a los diagnósticos que se puedan realizar en las granjas donde se presenten casos compatibles con la enfermedad de Marek.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
1803

8. Referencias

1. Abdul-Careem, M. F., Hunter, B. D., Sarson, A. J., Parvizi, P., Haghighi, H. R., Read, L., Sharif, S. (2008). Host responses are induced in feathers of chickens infected with Marek's disease virus. Virology, 370(2), 323–332.

2. Abdul-Careem, M. F., Haq, K., Shanmuganathan, S., Read, L. R., Schat, K. A., Heidari, M., & Sharif, S. (2009). Induction of innate host responses in the lungs of chickens following infection with a very virulent strain of Marek's disease virus. Virology, 393(2), 250–257.

3. Abdul-Careem, M. F., Javaheri-Vayeghan, A., Shanmuganathan, S., Haghighi, H. R., Read, L. R., Haq, K., Sharif, S. (2009). Establishment of an aerosol-based Marek's disease virus infection model. Avian Diseases, 53(3), 387–91.

4. Abujoub, A. A. & Coussens, P. M. (1997). Evidence that Marek's disease virus exists in a latent state in a sustainable fibroblast cell line. Virology, 229(2), 309–321.

5. Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D. L., & Kutish, G. F. (2001). The genome of turkey herpesvirus. Journal of Virology, 75(2), 971–978.

6. Ahanda, M., Ruby, T., Wittzell, H., Bed'Hom, B., Chaussé, A. M., Morin, V., Zoorob, R. (2009). Non-coding RNAs revealed during identification of genes involved in chicken immune responses. Immunogenetics, 61(1), 55–70.

7. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. Nature, 431(7006), 350–5.

8. Amor, S., Strassheim, S., Dambrine, G., Remy, S., Rasschaert, D., & Laurent, S. (2011). ICP27 protein of Marek's disease virus interacts with SR proteins and inhibits the splicing of cellular telomerase chTERT and viral vIL8 transcripts. Journal of General Virology, 92(6), 1273–1278.

9. Asif, M., Jenkins, K. A., Hilton, L. S., Kimpton, W. G., Bean, A. G., & Lowenthal, J. W. (2004). Cytokines as adjuvants for avian vaccines. Immunology and Cell Biology, 82(6), 638–643.

10. Atkins, K. E., Read, A. F., Savill, N. J., Renz, K. G., Walkden-Brown, S. W., & Woolhouse, M. E. (2011). Modelling Marek's Disease Virus (MDV) infection: parameter estimates for mortality rate and infectiousness. BMC Veterinary Research, 7(1), 70.

11. Baaten, B. J., Butter, C., & Davison, T. F. (2004). Study of host-pathogen interactions to identify sustainable vaccine strategies to Marek's disease. Veterinary Immunology and Immunopathology, 100(3–4), 165–177.

12. Baigent, S. J., Smith, L. P., Petherbridge, L. J., & Nair, V. K. (2011). Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB-1B strain of Marek's disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. Research in Veterinary Science, 91(1), 167–174.

13. Baigent, S. J., Petherbridge, L. J., Howes, K., Smith, L. P., Currie, R. J. W., & Nair, V. K. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. Journal of Virological Methods, 123(1), 53–64.

14. Baigent, S. J., Smith, L. P., Nair, V. K., & Currie, R. J. W. (2006). Vaccinal control of Marek's disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection. Veterinary Immunology and Immunopathology, 112(1–2), 78–86.

15. Baigent, S. J., Smith, L. P., Currie, R. J. W., & Nair, V. K. (2007). Correlation of Marek's disease herpesvirus vaccine virus genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. Avian Pathology, 36(6), 467–74.

16. Baigent, S. J., Smith, L. P., Currie, R. J. W., & Nair, V. K. (2005). Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation. The Journal of General Virology, 86(Pt 11), 2989–98.

17. Barbosa, T., Zavala, G., & Cheng, S. (2008). Molecular Characterization of Three Recombinant Isolates of Avian Leukosis Virus Obtained from Contaminated Marek ' s Disease Vaccines, 52(2), 245–252.

18. Barrow, A. D., Burgess, S. C., Howes, K., & Nair, V. K. (2003). Monocytosis is associated with the onset of leukocyte and viral infiltration of the brain in chickens infected with the very virulent Marek's disease virus strain C12/130. Avian Pathology, 32(2), 183–191.

19. Barrow, A. D., Burgess, S. C., Baigent, S. J., Howes, K., & Nair, V. K. (2003). Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: A new tropism for Marek's disease virus. Journal of General Virology, 84(10), 2635–2645.

20. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell, 116(2), 281–297.

21. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., & Izaurralde, E. (2006). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 71, 523–530.

22. Bilgutay, A. N., & Pastuszak, A. W. (2015). Peyronie's Disease: A Review of Etiology ., Diagnosis , and Management, 696–700.

23. Breedlove, C., Minc, J. K., Tang, D. C., van Santen, V. L., van Ginkel, F. W., & Toro, H. (2011). Avian influenza adenovirus-vectored in ovo vaccination: target embryo tissues and combination with Marek's disease vaccine. Avian Diseases, 55(4), 667–673.

24. Briles, W. E. (2004). Non-major histocompatibility complex alloantigen genes affecting immunity. Poultry Science, 83, 606–610.

25. Bumstead, N., Sillibourne, J., Rennie, M., Ross, N., & Davison, F. (1997). Quantification of Marek's disease virus in chicken lymphocytes using the polymerase chain reaction with fluorescence detection. Journal of Virological Methods, 65(1), 75–81.

26. Buranathai, C., Rodriguez, J., & Grose, C. (1997). Transformation of primary chick embryo fibroblasts by Marek's disease virus. Virology, 239(1), 20–35.

27. Burgess, S. C., Basaran, B. H., & Davison, T. F. (2001). Resistance to Marek's disease herpesvirus-induced lymphoma is multiphasic and dependent on host genotype. Veterinary Pathology, 38(2), 129–142.

28. Burgess, S. C., & Davison, T. F. (2002). Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: recognition by the monoclonal antibody AV37. Journal of Virology, 76(14), 7276–92.

29. Buscaglia, C. (2013). Mixed infections of Marek's disease and reticuloendotheliosis viruses in layer flocks in Argentina. Avian Diseases, 57, 569–571.

30. Buscaglia, C., Nervi, P., & Risso, M. (2004). Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolates on synergism between Marek's disease vaccine viruses. Avian Pathology, 33(March 2013), 190–195.

31. Butter, C., Staines, K., Baaten, B., Smith, L., & Davison, T. F. (2007). Route of challenge is critical in determining the clinical outcome of infection with a very virulent oncogenic herpesvirus, Marek's disease virus. Avian Pathology, 36(2), 93–99.

32. Calnek, B. W. (1972). Effects of passive antibody on early pathogenesis of Marek's disease. Infection and Immunity, 6(2), 193–198.

33. Canfield, R. E., Kammerman, S., Sobel, J. H., & Morgan, F. J. (1971). 1971 Nature Publishing Group. Nature, 232, 16–17.

34. Cantello, J. L., Parcells, M. S., Anderson, A. S., & Morgan, R. W. (1997). Marek's disease virus latency-associated transcripts belong to a family of spliced RNAs that are antisense to the ICP4 homolog gene. Journal of Virology, 71(2), 1353–1361.

35. Cao, W., Mays, A. B. J., Dunn, A. J., Fulton, A. R., Silva, C. R., & Ad, A. F. (2013). Research Note — Use of Polymerase Chain Reaction in Detection of Marek ' s

Disease and Reticuloendotheliosis Viruses in Formalin-Fixed , Paraffin-Embedded Tumorous Tissues, 57(6), 785–789.

36. Carvallo, F. R., French, R. a, Gilbert-Marcheterre, K., Risatti, G., Dunn, J. R., Forster, F., Smyth, J. a. (2011). Mortality of One-Week-Old Chickens During Naturally Occurring Marek's Disease Virus Infection. Veterinary Pathology, 48(5), 993–998.

37. Chakraborty, S., Veettil, M. V., Bottero, V., & Chandran, B. (2012). PNAS Plus: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with EphrinA2 receptor to amplify signaling essential for productive infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109, E1163–E1172.

38. Chakraborty, S., Veettil, M. V., & Chandran, B. (2012). Kaposi's sarcoma associated herpesvirus entry into target cells. Frontiers in Microbiology, 3(JAN), 1–13.

39. Chandran, B. (2010). Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of target cells. Journal of Virology, 84(5), 2188–99.

40. Chang, K.-S., Lee, S.-I., Ohashi, K., Ibrahim, A., & Onuma, M. (2002). The Detection of the meq Gene in Chicken Infected with Marek's Disease Virus Serotype 1. Journal of Veterinary Medical Science, 64(5), 413–417.

41. Chbab, N., Egerer, A., Veiga, I., Jarosinski, K. W., & Osterrieder, N. (2010). Viral control of vTR expression is critical for efficient formation and dissemination of lymphoma induced by Marek's disease virus (MDV). Veterinary Research, 41(5).

42. Chen, H., Wang, W., Song, C., Yu, S., & Ding, C. (2010). Marek's disease virus VP22 enhances potentially the immune response of ESAT-6/CFP-10 against

Mycobacterium bovis infection. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 42(5), 337–344.

43. Cheng, Y., Cong, F., Zhang, Y., Li, Z., Xu, N., Hou, G. & Liu, C. (2012). Genome sequence determination and analysis of a Chinese virulent strain, LMS, of Gallid herpesvirus type 2. Virus Genes, 45(1), 56–62.

44. Chi, J., Teng, M., Yu, Z., Xu, H., Su, J., Zhao, P., Luo, J. (2015). Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF-β signaling pathway. Virology, 476, 72–84.

45. Chickens, R. (1974). Replication of Marek ' s Disease Virus in Cell Cultures Derived from Genetically Resistant Chickens. Microbiology, 9(6), 1092–1097.

46. Cho, B. R., & Kenzy, S. G. (1975). Virologic and serologic studies of zoo birds for Marek's disease virus infection. Infection and Immunity, 11(4), 809–814.

47. Cho, B. R., & Kenzy, S. G. (1972). Isolation and Characterization of an Isolate (HN) of Marek ' s Disease Virus with Low Pathogenicity. Microbiology, 24(3), 299–306.

48. Cho, K. O., Endoh, D., Onuma, M., & Itakura, C. (1999). Analysis of transcriptional and translational activities of Marek's disease (MD) virus genes in MD central nervous system lesions in chickens. Avian Pathology, 28(1), 47–53.

49. Cho, K. O. (1999). Electron microscopic and immunohistochemical localization of Marek's disease (MD) herpesvirus particles in MD skin lymphomas. Veterinary Pathology, 36(4), 314–320.

50. Collins, M., Ling, V., & Carreno, B. M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. Genome Biology, 6(6), 223.

51. Cortes, A., Montiel, E., Lemiere, S., & Gimeno, I. (2011). Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's disease vaccination by real time-PCR. Avian Diseases, 55(2), 302–310.

52. Cortes, A. L., Montiel, E. R., & Gimeno, I. M. (2009). Validation of Marek's Disease Diagnosis and Monitoring of Marek's Disease Vaccines from Samples Collected in FTA® Cards. Avian Diseases, 53(4), 510–516.

53. Cortes, A. L., & Cardona, C. J. (2004). Pathogenesis of a Marek's disease virus mutant lacking vIL-8 in resistant and susceptible chickens. Avian Diseases, 48(1), 50–60.

54. Coupeau, D., Dambrine, G., & Rasschaert, D. (2012). Kinetic expression analysis of the cluster mdv1-mir-M9-M4, genes meq and viL-8 differs between the lytic and latent phases of marek's disease virus infection. Journal of General Virology, 93(PART 7), 1519–1529.

55. Cui, H., Gao, H., Cui, X., Zhao, Y., Shi, X., Li, Q., Wang, Y. (2013). Avirulent Marek's Disease Virus Type 1 Strain 814 Vectored Vaccine Expressing Avian Influenza (AI) Virus H5 Haemagglutinin Induced Better Protection Than Turkey Herpesvirus Vectored AI Vaccine. PLoS ONE, 8(1), 1–9.

56. Cui, X., Lee, L. F., Reed, W. M., Kung, H.-J., & Reddy, S. M. (2004). Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. Journal of Virology, 78(9), 4753–60.

57. Cui, Z. Z., Lee, L. F., Liu, J. L., & Kung, H. J. (1991). Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. Journal of Virology, 65(12), 6509–15.

58. Cullen, B. R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. Molecular Cell, 16(6), 861–865.

59. Dabbs, D. J. (2006). Diagnostic Immunohistochemistry (Second Edition), 828.

60. Davidson, I., Borenshtain, R., & Weisman, Y. (2002). Molecular identification of the Marek's disease virus vaccine strain CVI988 in vaccinated chickens. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 49(2), 83–87.

61. De Chiara, G., Marcocci, M. E., Sgarbanti, R., Civitelli, L., Ripoli, C., Piacentini, R., Palamara, A. T. (2012). Infectious agents and neurodegeneration. Molecular Neurobiology, 46(3), 614–638.

62. Deem, S. L., Rivera-Parra, J. L., & Parker, P. G. (2012). Health evaluation of Galapagos Hawks (Buteo galapagoensis) on Santiago Island, Galapagos. Journal of Wildlife Diseases, 48(1), 39–46.

63. Deiters, A. (2010). Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway. The AAPS Journal, 12(1), 51–60.

64. Denesvre, C., & a, C. D. (2013). Marek's Disease Virus Morphogenesis Review Article — Marek's Disease Virus Morphogenesis, 57, 340–350.

65. Ding, J., Cui, Z., Lee, L. F., Cui, X., & Reddy, S. M. (2006). The role of pp38 in regulation of Marek's disease virus bi-directional promoter between pp38 and 1.8-kb mRNA. Virus Genes, 32(2), 193–201.

66. Direkze, S., & Laman, H. (2004). Regulation of growth signalling and cell cycle by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genes. International Journal of Experimental Pathology, 85(6), 305–319.

67. Djeraba, A., Musset, E., Bernardet, N., Vern, Y. Le, & Quéré, P. (2002). Similar pattern of iNOS expression, NO production and cytokine response in genetic and vaccination-acquired resistance to Marek's disease. Veterinary Immunology and Immunopathology, 85(1–2), 63–75.

68. Djeraba, A., Musset, E., Lowenthal, J. W., Boyle, D. B., Chaussé, A.-M., Péloille, M., & Quéré, P. (2002). Protective effect of avian myelomonocytic growth factor in infection with Marek's disease virus. Journal of Virology, 76(3), 1062–70.

69. Dorange, F., Tischer, B. K., Vautherot, J.-F., & Osterrieder, N. (2002). Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. Journal of Virology, 76(4), 1959–1970.

70. Dudnikova, E., Norkina, S., Vlasov, A., Slobodchuk, A., Lee, L. F., & Witter, R. L. (2007). Evaluation of Marek's disease field isolates by the "best fit" pathotyping assay. Avian Pathology, 36(March 2013), 135–143.

71. Dunn, J. R., & Silva, R. F. (2012). Ability of MEQ-deleted MDV vaccine candidates to adversely affect lymphoid organs and chicken weight gain. Avian Diseases, 56(3), 494–500.

72. Dunn, J. R., Silva, R. F., Lee, L. F., & Witter, R. L. (2012). Competition between two virulent Marek's disease virus strains in vivo. Avian Pathology, 41(3), 267–75.

73. Dunn, J. R., Witter, R. L., Silva, R. F., Lee, L. F., Finlay, J., Marker, B. A., Fitzgerald, S. D. (2010). The effect of the time interval between exposures on the susceptibility of chickens to superinfection with Marek's disease virus. Avian Diseases, 54(3), 1038–49.

74. Engel, A. T., Selvaraj, R. K., Kamil, J. P., Osterrieder, N., & Kaufer, B. B. (2012). Marek's disease viral interleukin-8 promotes lymphoma formation through targeted recruitment of B cells and CD4+ CD25+ T cells. Journal of Virology, 86(16), 8536–45.

75. Gimeno, I. M., Cortes, A. L., Witter, R. L., & Pandiri, A. R. (2012). Optimization of the protocols for double vaccination against Marek's disease by using commercially available vaccines: evaluation of protection, vaccine replication, and activation of T cells. Avian Diseases, 56(2), 295–305.

76. Gimeno, I. M., Witter, R. L., Hunt, H. D., Reddy, S. M., Lee, L. F., Silva, R. F., Silva, R. F. (2005). The pp38 Gene of Marek ' s Disease Virus (MDV) Is Necessary for Cytolytic Infection of B Cells and Maintenance of the Transformed State but Not for Cytolytic Infection of the Feather Follicle Epithelium and Horizontal Spread of MDV The pp38 Gene of Marek, Journal of Virology 79(7), 4545–4549.

77. Gimeno, I. M., Witter, R. L., & Neumann, U. (2002). Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus. Avian Diseases, 46(4), 909–918.

78. Gimeno, I. M. (2008). Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? Vaccine, 26(SUPPL. 3).

79. Gimeno, I. M., & Cortes, A. L. (2011). Chronological study of cytokine transcription in the spleen and lung of chickens after vaccination with serotype 1 Marek's disease vaccines. Vaccine, 29(8), 1583–1594.

80. Gimeno, I. M., & Cortes, A. L. (2010). Evaluation of factors influencing replication of serotype 1 Marek's disease vaccines in the chicken lung. Avian Pathology, 39(April), 71–79.

81. Gopal, S., Manoharan, P., Kathaperumal, K., Chidambaram, B., & Divya, K. C. (2012). Differential detection of avian oncogenic viruses in poultry layer farms and Turkeys by use of multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 50(8), 2668–2673.

82. Heidari, M., Fitzgerald, S. D., Zhang, H. M., Silva, R. F., Lee, L. F., & Dunn, J. R. (2007). Marek'S Disease Virus-Induced Skin Leukosis in Scaleless Chickens: Tumor Development in the Absence of Feather Follicles. Avian Diseases Digest, 2(3), e5–e5.

83. Heidari, M., Huebner, M., Kireev, D., & Silva, R. F. (2008). Transcriptional profiling of Marek's disease virus genes during cytolytic and latent infection. Virus Genes, 36(2), 383–392.

84. Islam, A., Harrison, B., Cheetham, B. F., Mahony, T. J., Young, P. L., & Walkden-Brown, S. W. (2004). Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 119(2), 103–113.

85. Jin, Y.-C., Wei, P., Wei, X.-X., Zhao, Z.-Y., & Li, Y. (2010). Marek's disease resistant/susceptible MHC haplotypes in Xiayan chickens identified on the basis of BLB2 PCR-RFLP and BLB2/BF2 sequence analyses. British Poultry Science, 51(4), 530–9.

86. Kowalczyk, A., Markowska-Daniel, I., & Rasmussen, T. B. (2013). Development of a primer-probe energy transfer based real-time PCR for the detection of Swine influenza virus. Journal of Virological Methods, 187(2), 228–233.

87. Lee, L. F., Cui, X., Cui, Z., Gimeno, I., Lupiani, B., & Reddy, S. M. (2005). Characterization of a very virulent Marek's disease virus mutant expressing the pp38 protein from the serotype 1 vaccine strain CVI988/Rispens. Virus Genes, 31(1), 73–80.

88. Li, X., Jarosinski, K. W., & Schat, K. A. (2006). Expression of Marek's disease virus phosphorylated polypeptide pp38 produces splice variants and enhances metabolic activity. Veterinary Microbiology, 117(2–4), 154–168.

89. Ono, M., Maeda, K., Kawaguchi, Y., Jang, H. K., Tohya, Y., Niikura, M., & Mikami, T. (1995). Expression of Marek's disease virus (MDV) serotype 2 gene which has partial homology with MDV serotype 1 pp38 gene. Virus Research, 35(2), 223–229.

90. Shamblin, C. E., Greene, N., Arumugaswami, V., Dienglewicz, R. L., & Parcells, M. S. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: Association of meq mutations with MDVs of high virulence. Veterinary Microbiology, 102(3–4), 147–167.

91. Venugopal, K. (2000). Marek's disease: An update on oncogenic mechanisms and control. Research in Veterinary Science, 69(1), 17–23.

92. Xie, Q., Anderson, A. M. Y. S., & Morgan, R. W. (1996). Marek ' s Disease Virus (MDV) ICP4, pp38, and meq Genes Are Involved in the Maintenance of Transformation of MDCC- MSB1 MDV-Transformed Lymphoblastoid Cells. Journal of Virology 70(2), 1125–1131.

93. Yu, Y., Luo, J., Mitra, A., Chang, S., Tian, F., Zhang, H., … Song, J. (2011). Temporal transcriptome changes induced by MDV in marek's disease-resistant and -susceptible inbred chickens. BMC Genomics, 12(1), 501

94. Huijsmans, C. J., Damen, J., van der Linden, J. C., Savelkoul, P. H., & Hermans, M. H. (2010). Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications. BMC Research Notes, 3, 239.

95. Tian, M., Zhao, Y., Lin, Y., Zou, N., Liu, C., Liu, P., Huang, Y. (2011). Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. Virology Journal, 8(1), 121.

96. Handberg, K. J., Nielsen, O. L., & Jørgensen, P. H. (2014). The use of serotype 1- and serotype 3- specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens, Avian Pathology, August, 37–41.

97. Murata, S., Chang, K.-S., Lee, S.-I., Konnai, S., Onuma, M., & Ohashi, K. (2007). Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Method to Detect Oncogenic Marek's Disease Virus from Feather Tips. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19(5), 471–478. 219.

98. Renz, K. G., Islam, A., Cheetham, B. F., & Walkden-Brown, S. W. (2006). Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. Journal of Virological Methods, 135(2), 186–191. 235.

99. Silva, R. F., Fadly, A. M., & Taylor, S. P. (2007). Development of a polymerase chain reaction to differentiate avian leukosis virus (ALV) subgroups: detection of an ALV contaminant in commercial Marek's disease vaccines. Avian Diseases, 51(3), 663–7.

100. Taylor, P., Davidson, I., Borovskaya, A., Perl, S., & Malkinson, M. (1995). Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. Avian Pathology, 24(July 2012), 69–94.

101. Davison F. & Nair V., EDS. (2004). Marek's disease: An Evolving Problem. Elsevier Press, Amsterdam, the Netherlands and Boston, USA.

102. Reddy, S., Lupiani, B., Gimeno, I., Silva, R., Lee, L. & Witter R. (2002) Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: Use of a pp38

mutant to validate the technology for the study of gene function. PNAS. Vol. 99. No. 10.

103. Pejovi N., Maja V., Polacek V., Sanja A., Marinkovic D., and Milijana K. (2007) Morphological and immunohistochemical examination of tumor cells in Marek's disease. Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 57. No. 1, 27-35.

104. Gimeno I., Witter R., Hunt H., Lee L., Reddy S., and Neumann U. (2001) Marek's Disease Virus Infection in the Brain: Virus Replication, Cellular Infiltration, and Major Histocompatibility Complex Antigen Expression. Vet Pathol 38:491–503.

105. Raja A., Dhinakar G., Bhuvaneswari P., Balachandran C., Kumanan K. (2009) Detection of virulent Marek's disease virus in poultry in India. Acta virologica 53: 255 – 260