



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**"FACTOR DE LA INHIBICION DE LA MIGRACION DE
LOS MACROFAGOS (MIF) EN AVES DE POSTURA
VACUNADAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK"**

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Luis Jaime Aguilar Sendejas

Asesores: MVZ. Aurora Velázquez Echegaray

MVZ Gerardo Elías Dillman



México, D. F.

Mayo 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	15
CONCLUSION.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19

RESUMEN

La prueba del Factor de la Inhibición de la Migración de los Macrófagos (MIF) se utilizó para determinar inmunidad celular en 82 -- muestras de sangre de aves de postura entre las 50 y 54 semanas de edad, procedentes de la Granja Experimental Avícola y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.-- Las aves fueron vacunadas al primer día de nacidas contra el virus de la enfermedad de Marek. Diez aves Libres de Patógenos Específicos (SPF) de la misma edad y sin vacunar, criadas en el Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., fueron utilizadas como testigos negativos.

Las células procedentes del 71.9 % de las aves vacunadas presentaron reacción positiva al MIF y, el 28.1 % presentaron reacción negativa. No se determinó respuesta inmune-celular con las células procedentes de las aves testigo.

Se consideró que el virus vacunal fue capaz de sensibilizar en forma específica a los linfocitos "T", indicativa de una respuesta inmune de tipo celular.

INTRODUCCION

La enfermedad de Marek es un padecimiento viral de las aves, -- con una distribución mundial; caracterizada por una rápida difusión en la parvada, tumores linfoides en varios órganos y tejidos, parálisis de las patas o de las alas y ceguera (4,9,24).

La enfermedad fué identificada por primera vez en los Estados Unidos de Norteamérica en 1956 (24,28); y su importancia económica en la Industria Avícola de este país llegó a ser considerable en el período entre 1960 a 1970, donde se reporta que las tasas de mortalidad en las parvadas alcanzaron entre el 25 % al 30 %, y en ocasiones hasta un 60 %; ya que además de atacar a gallinas ponedoras, el problema también se acentuó en el pollo de engorda (4,5,24,28). Subsecuentemente al primer reporte en los E.U.A., la enfermedad se propagó a otros países como México (24,28).

En México, Cruz et al (5) informaron que los decomisos por la enfermedad de Marek en el Rastro de Ferrería entre los años 1970 a 1973 aumentaron siete veces; del 6.7 % en 1970, al 42.6 % en 1973.- Posteriormente con el amplio uso y efectividad de la vacuna, la enfermedad fué controlada (4,5,24).

En 1980 se presentó otro brote de la enfermedad de Marek en la República Mexicana, el cual está registrado en los Análisis Estadísticos de Brotes de la Subdirección de Programación y Desarrollo Zoonosanitario de la Dirección General de Sanidad Animal (S.A.R.H.) (23),

donde se informa que la mortalidad por la enfermedad de Marek para - 1979 fué de 0.61 % y que aumentó al 9.12 % en 1980.

La vacuna que se desarrolló en 1970 a partir de un virus Herpes de pavo, ha demostrado en pruebas de laboratorio y de campo, que confiere una protección satisfactoria a las aves expuestas al virus patógeno (4,18,19,20,25). La frecuencia de nuevos brotes de la enfermedad de Marek a pesar del uso de la vacuna, podrían atribuirse a las deficiencias en la elaboración, control y manejo de las vacunas (24).

El aislamiento del virus de la enfermedad de Marek, ha permitido detectar la presencia de antígenos y anticuerpos por técnicas como las de difusión en gel de agar, inmunofluorescencia, virus neutralización, hemaglutinación (3,4,13,24); y se ha visto que existen -- reacciones cruzadas con otros Herpetovirus como el virus Epstein- -- Barr, el virus del tumor Lucké de la rana, pseudorabia y los virus - Herpes simple tipo 1 y 2 (13,24).

El virus de la enfermedad de Marek provoca inmunosupresión del sistema retículo endotelial (4,14,25). En aves bursectomizadas o timectomizadas, no es posible evitar las lesiones de la enfermedad de Marek (4,13,14,24). En el primer caso, las aves resistieron el desafío después de haber sido vacunadas con una cepa atenuada de virus - de la enfermedad de Marek (4,24); y en el segundo, se estableció un incremento de linfonos en los pollos (4,24).

En los linfomas y nervios con lesiones linfoproliferativas causadas por la enfermedad de Marek, se ha confirmado por estudios de inmunofluorescencia, que están formados por más del 80 % de linfocitos "T" (Células del timo) y menor del 20 % de linfocitos "B" (Células de la bolsa de Fabricio) (12,15,24).

Estas investigaciones indican que el timo y sus derivados linfoides son los responsables de la patogenia y de una inmunidad a nivel celular para la enfermedad de Marek, sin embargo el mecanismo de esta inmunidad no está bien esclarecido (3,4,13,24).

Los linfocitos "T" sensibilizados cuando son activados nuevamente por el antígeno producen factores solubles llamadas Linfocinas, - las que pueden ser demostradas por diversas pruebas de acuerdo a su característica y acción (1,2,16,22,26,27).

Una de estas Linfocinas es el Factor de la Inhibición de la Migración de los Macrófagos (MIF); y se puede demostrar in vitro a partir de células sensibilizadas, retardando la migración de los macrófagos en tubos capilares bañados en un medio de cultivo, al ponerse nuevamente en contacto con el antígeno (1,2,6,7,8,10,16,17,21,22,26,27).

El MIF es una glicoproteína ácida, con peso molecular de 35,000 a 50,000 Daltons, es termoestable, no es dializable; y su actividad

no se ve afectada por la DNasa o RNasa, pero sí por la tripsina y -- quimotripsina. En filtros de shephadex G-100 ó 75 se filtra como las sustancias con peso molecular parecido a la albúmina, y en gel de poliacrilamida a un pH de 9.1 migra como prealbúmina (3,11,22,26,27).

Debido al carácter del virus de la enfermedad de Marek de asociarse a las células, las técnicas de virus-neutralización utilizadas para su diagnóstico son sofisticadas y caras. Esto provoca que actualmente el título de las vacunas se mida en Unidades Formadoras de Placa (UFP) en diferentes cultivos celulares (4,13,24), teniendo el inconveniente que indica el número de células infectadas y no la potencia de las vacunas.

Los estudios de MIF sobre diferentes antígenos (2,6,7,16,17,22, 27) ha permitido conocer que es una prueba altamente sensible y fácil de llevar a cabo, por lo que ofrece una posibilidad para determinar la potencia de las vacunas en base a inmunidad celular en aves.

El propósito del presente trabajo fué demostrar que mediante la prueba de MIF las aves son capaces de responder cuantitativamente a la respuesta inmune-celular al virus de la enfermedad de Marek, obteniéndose por esta técnica el porcentaje de animales protegidos en la parvada contra la enfermedad de Marek.

MATERIAL Y METODOS

I.- MATERIAL:

a).- Muestras sanguíneas de 82 aves de postura de la línea Dekalb entre las 50 y 54 semanas de edad, vacunadas - al primer día de nacidas con el virus de la enfermedad de Marek, procedentes de la Granja Experimental - Avícola y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Muestras sanguíneas de 10 aves Libres de Patógenos Específicos (SPF) de la misma edad sin vacunar, utilizadas como testigos negativos, criadas en el Departamento de Virología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.,

b).- Virus vivo de la enfermedad de Marek replicado en fibroblastos de embrión de pollo a partir de una vacuna comercial. (*)

c).- Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) modificado con - pH de 8.2 (*)

d).- Cámaras de Bloom tipo MIF. (Figura #1).

II.- METODO:

a).- La técnica que se utilizó para la prueba de MIF, es la descrita por Saldívar (22), siendo de la siguiente forma:

1.- Tomar 9 cc. de sangre de cada ave en 1 cc. de anticoagulante (E.D.T.A. al 1.5% en solución salina).

(*) Elaborado en el Departamento de Virología e Inmunología de la U.N.A.M., U.N.A.M.

- 2.- Centrifugar a 1500 R.P.M. durante 20 minutos.
- 3.- Eliminar el sobrenadante.
- 4.- Reconstituir con solución salina fisiológica al --
0.85 %.
- 5.- Repetir los pasos 2,3,4 dos veces más, de tal forma que se realicen tres lavadas de células.
- 6.- Separar la capa flogística en tubos capilares.
- 7.- Sellar los capilares y centrifugar a 1000 R.P.M. --
durante 5 minutos.
- 8.- Cortar los capilares en la interfase células-sobrenadante, utilizando un lápiz de diamante.
- 9.- El trozo de capilar que contiene las células blancas se coloca en la cámara de Bloom, fijándose sobre una gota de silicón estéril y se sella con cubreobjetos y parafina caliente.
- 10.- Para la prueba control, se llena lentamente el compartimiento de la cámara de Bloom con H₂O y se sellan los orificios.
- 11.- Para la prueba problema, se llena el compartimiento hasta la mitad con H₂O, se adiciona 0.2 cc. del antígeno, se termina de llenar con H₂O y se sella.
- 12.- Mantener la cámara en posición vertical durante --
5 - 10 minutos.
- 13.- Incubar en cámara húmeda durante 24 - 48 horas horizontalmente a 37 °C.

- 14.- La lectura se hace con un retroproyector, delimitando las áreas de migración sobre un papel milimétrico.
- 15.- Se cuentan los cuadros que ocupa la migración del control y problema, los primeros representan el - el 100 % de migración, en base a éste se determina el porcentaje de inhibición de la muestra problema; valores superiores al 15 % de inhibición - se consideran positivos al NIF.

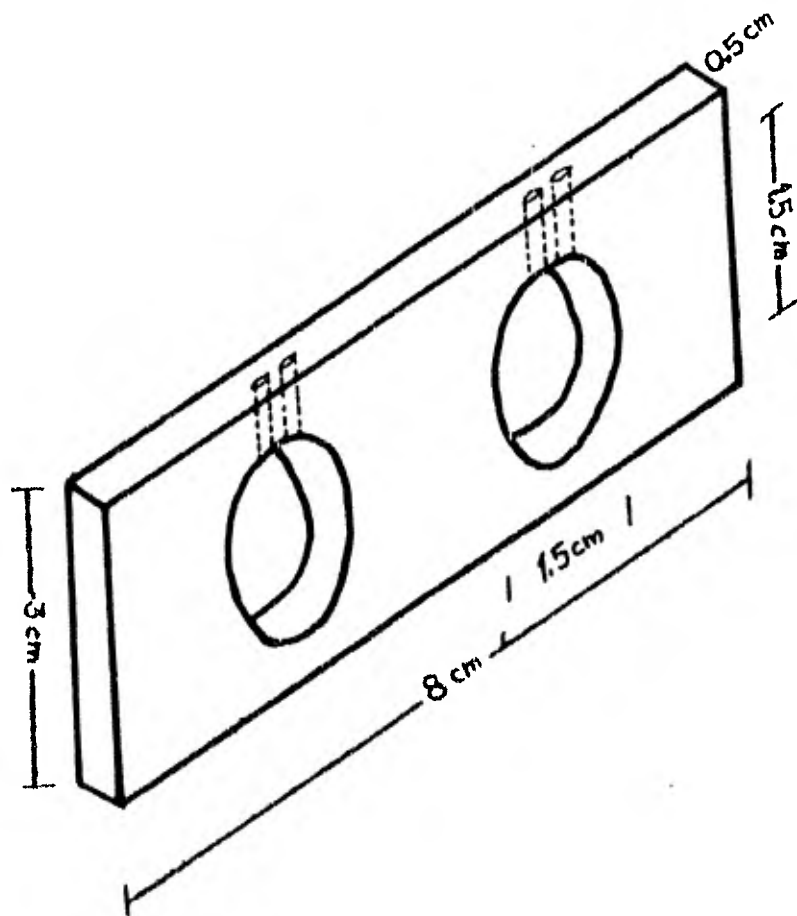


Figura # 1.- Cámara de Bloom Tipo III.

RESULTADOS

De las muestras de leucocitos de aves vacunadas, en los controles con antígeno se vio una clara inhibición de células, mientras -- que en los controles sin antígeno se observó una migración franca de células hacia afuera de los tubos capilares en forma de abanico (Figura # 2). Se tomó como índice de inhibición el 15 % o mayor para -- que se considere que dicho factor esté presente; y valores menores -- del 15 % se consideraron como negativos (2,6,21,22,27).

De las 82 pruebas de aves vacunadas, el 71.9 % representadas -- por 59 muestras se pudo determinar que las células son sensibles a -- la prueba de MIF, mientras que el 28.1 % representadas por 23 muestras no se observó inmunidad celular por dicha prueba. En las 10 --- pruebas de aves sin vacunar, no se presentó inmunidad celular contra el virus de la enfermedad de Marek (Cuadro # 1).

Figura # 2

Sin antígeno



a.- Control. Franca migración de células

Con antígeno



b.- Problema. Clara inhibición de células

CUADRO # 1

RESULTADOS Y TOTALES DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LAS MUESTRAS
TRABAJADAS

I.- MUESTRAS DE AVES VACUNADAS

POSITIVAS	59
NEGATIVAS	23
TOTAL	82

2.- MUESTRAS DE AVES NO VACUNADAS

POSITIVAS	0
NEGATIVAS	10
TOTAL	10

CUADRO # 2

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LAS MUESTRAS POSITIVAS
EN AVES VACUNADAS

<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION</u>
1.....	15
1.....	16
2.....	17
2.....	18
2.....	21
6.....	22
1.....	25
4.....	26
2.....	27
2.....	28
3.....	29
1.....	30
3.....	32
2.....	35
1.....	36
2.....	37
2.....	38
3.....	39
1.....	40
1.....	41
2.....	42
1.....	43
2.....	44
1.....	45
2.....	47
1.....	49
2.....	52
1.....	56
1.....	58
3.....	59
1.....	78
Total	59

Tomando como 100 % de migración al control y restando el porcentaje del problema, según se indicó en el método descrito por Saldívar (22).

CUADRO # 3

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LAS MUESTRAS NEGATIVAS
EN AVES VACUNADAS

<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION</u>
1.....	0
2.....	1
3.....	2
3.....	3
2.....	5
1.....	6
3.....	8
3.....	10
2.....	11
1.....	12
2.....	14
Total 23	

Tomando como 100 % de migración al control y restando el porcentaje del problema, según se indicó en el método descrito por Saldívar (22).

CUADRO # 4

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LAS MUESTRAS DE AVES --

CONTROL NO VACUNADAS

<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>PORCENTAJE DE INHIBICION</u>
2.....	0
1.....	1
3.....	2
1.....	4
2.....	6
1.....	8
Total 10	

Tomando como 100 % de migración al control y restando el porcentaje del problema, según se indicó en el método descrito por Saldívar (22).

DISCUSION

Las reacciones inmunes, principalmente las mediadas por células son de importancia capital para la inmunidad contra muchas infecciones virales y enfermedades neoplásicas (11,12,13,15,26), tal es el caso de la enfermedad de Marek que es el único padecimiento linfoproliferativo de etiología viral comprobada, que se previene casi en un 100 % con el uso de una vacuna (4,13,18,19,20,24,25,28), por lo que se considera el descubrimiento más importante de la época sobre el cáncer.

El mecanismo de protección no ha sido totalmente esclarecido, la hipótesis más aceptada que trata de aclarar el curso de la transformación neoplásica por virus fué expuesta por Jawetz (11) y Schat (24), esta hipótesis dice que las células una vez alteradas por el genoma viral poseen nuevos antígenos en la superficie, lo cual estimula una respuesta de anticuerpos antitumorales y linfocitos sensibilizados; se menciona que el interferón inducido por el virus vacunal puede ser responsable de una rápida protección; otro posible mecanismo es la interferencia viral, donde el virus vacunal se replica intracelularmente en forma de provirus bloqueando receptores no permitiendo la entrada al virus de campo (4,13,24); también se menciona que la inmunidad mediada por células a través de la liberación de mediadores, como las linfoquinas, que tienen un papel importante en la lisis de células malignas (11,26).

Es un hecho bien establecido que la prueba de MIF sólo puede --

ser demostrada cuando se encuentran presentes linfocitos sensibilizados y el antígeno específico (1,6,7,8,10,16,17,21,22,27) y que una respuesta de linfocitos "T", indicativa de inmunidad celular, ocurre en pollos infectados con el virus de la enfermedad de Marek (12,13,15,24).

Las aves utilizadas en este trabajo fueron vacunadas al primer día de nacidas por la casa incubadora que las vendió, y el hecho de que el 28.1 % de los animales vacunados fueran negativos a la prueba de inmunidad celular, indica las siguientes posibilidades:

- a). De que a las aves reproductoras cuando se les vacuna contra la enfermedad de Marek, transmiten a su descendencia anticuerpos -- congénitos que van a inactivar al virus vacunal cuando las pollitas son inmunizadas (4,13,24,28).
- b). Que la resistencia genética también pudo alterar los resultados, ya que está demostrado que existen diferencias en la producción de anticuerpos neutralizantes al virus de la enfermedad de Marek entre líneas susceptibles y líneas resistentes (4,9,24).
- c). La inoculación de vacunas con títulos bajos, mal manejo y/o mala inoculación, además la posibilidad de que hayan sido vacunadas -- cuando existía un estado de tensión u asociación con otras enfermedades que inhiben una respuesta a la vacuna (24).

La vacuna aplicada en pollitas al primer día de nacidas, protegió durante toda la vida comercial a las aves contra la enfermedad --

de Marek (14,13,24), como se observó en este trabajo en el que se utilizaron aves de 50 a 54 semanas de edad próximas a terminar su ciclo de postura.

El método in vitro de hipersensibilidad mediada por células estudiado en las aves, como pudo ser demostrado aquí, puede ser usado para determinar inmunidad conferida por vacunas contra la enfermedad de Marek, por lo que se sugiere que se realicen otras pruebas comparativas que permitan valorar la eficiencia de la técnica de MIF para el virus de la enfermedad de Marek, ya que al revisar bibliografía no se encontraron referencias de pruebas semejantes sobre este antígeno.

CONCLUSIONES

La técnica de MIF, permitió comprobar en forma objetiva la inmunidad celular in vitro, contra el virus de la enfermedad de Marek.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- BARRET, T.J.: Introducción a la Inmunoquímica y a la Inmunología. 2 ed., Edit. Interamericana, México. 1972
- 2.- BORDIER, L.D.D.: El método de la inhibición de la migración de los macrófagos para detectar inmunidad celular en la rinotraqueítis infecciosa bovina. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1980
- 3.- BYERLY, J.L. and DAWE, D.L.: Delayed hypersensitivity reaction in marek's disease virus infected chickens. Amer. Jour. Vet. Res. 33: 2267-2272 (1972)
- 4.- CALNEK, B.W. and WITTER, R.L.: Marek's Disease. In: Disease of poultry (Edit. by Hofstad, H.S.). 7th edit. Ames Iowa, U.S.A., Iowa State University Press: 385-418 1978
- 5.- CRUZ, G.A., HOYA, H.R., GONZALEZ del, A.J. y SCHAT, A.K.: Importancia económica de la enfermedad de marek en el valle de México. Vet. Méx. 4: 125-129 (1974)
- 6.- DAVID, J.R., AL-SCARI, S., LAURENCE, P.S. and THOMAS, L.: The specificity of inhibition of cell migration by antigens. J. of Immunol. 93: 264-272 (1964)

- 7.- DAVID, J.R., LAWRENCE, H.S. and THOMAS, L.: Effect of sensitive cells on normal cells in the presence of antigen. J. of Immunol. 93: 274-278 (1964)
- 8.- DAVID, J.R., LAWRENCE, H.S. and THOMAS, L.: The specificity of hapten-protein conjugates in the inhibition of cell migration. J. of Immunol. 93: 279-282 (1964)
- 9.- GORDON, R.F.: Enfermedades de las aves. Edit. El Manual Moderno, México, D.F. 1980
- 10.- HERBERT, W.J.: Veterinary Immunology. Blackwell Scientific -- Publication, London. 1974
- 11.- JAWETZ, E., MELNICK, J.L. y ADELBERG, E.A.: Manual de Microbiología Médica. 6 ed., Edit. El Manual Moderno, México, D.F. 1975
- 12.- NAZARIAN, K., ACKERSON, A. and HOOPER, C.: Scanning electron microscopy in the study of chicken T and B cells and cells -- from Marek's disease tumours. Avian Path. 5: 135-145 (1975)

- 13.- HAZERIAN, K.: Virology and Immunology of marek's disease. En: Oncogenesis and Herpesviruses (Edited by: NEGOS, P.M. and --- others). 59-71. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1972

- 14.- PATTERSON, L.T. and HOUSE, c.s.: The effect of immunosuppression and immunostimulation on the incidence and severity of marek's disease. Poul. Sci. 54: 1804 (1975)

- 15.- PAYNE, L.N. and REINIE, M.: The proportion of B and T lymphocytes in lymphomas, peripheral nerves and lymphoid organs in marek's disease. Avian Path. 5: 147-154 (1976)

- 16.- POUJ, H.A.D.: Estudio de la inmunidad mediada por células en aves, contra la enfermedad de newcastle, por la técnica en -- placa de agarosa de Clausen. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. -- 1980

- 17.- REPANA, R.A.: La prueba de FIB en el control de vacunas contra la infección de la bolsa de Fabricio (I.B.F.). Tesis de -- licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1981

- 18.- RISPEIS, B.H., VAN-VLOTEI, H., MASTENBROEK, H. and HENDRICK, J.L.: Isolation of an avirulent marek's disease virus (Strain (CVI-988) and its use in laboratory vaccination trials. Avian Dis. 16: 109-125 (1972)
- 19.- RISPEIS, B.H., VAN-VLOTEI, H., MASTENBROEK, H. and HENDRICK, J.L.: Field trials on vaccination whit an avirulent strain --
- 20.- RISPEIS, B.H., SCHAT, K.A., VAN-VLOTEI, H. y MAAS, H.J.: Inves-
tigaciones recientes sobre la enfermedad de marek en Holanda. Tec. Pec. Méx. 13: 74-83 (1971)
- 21.- ROCKLIN, R.E.: Production and assay of macrophage migration -
inhibitory factor. En: Manual of Clinical Immunology (Edited
by ROSE, H.R., FRIEDMAN, H.). 2 edit. American Society for --
Microbiology, Washington: 246-251 1980
- 22.- SALDIVAR, Z.E.: Determinación de la inmunidad celular en ----
aves vacunadas contra la enfermedad de newcastle por medio de
la prueba de MIF. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y
Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1980

- 23.- S.A.R.H.- Análisis Estadísticos de Brotes de la Subdirección de Programación y Desarrollo Zoonosanitario de la Dirección General de Sanidad Animal. (1979 y 1980)
- 24.- SCHAT, K.A. y GONZALEZ del, A.J.: La enfermedad de marek. En: Ciencia Veterinaria I (Edit. por MORENO, CH.R.). 298-322. --- Fac. de Med. Vet. y Zoot. 1976
- 25.- SPENCER, J.L., GRUNDER, A.A., ROBERTSON, A. and SPECIMAN, --- G.W.: Attenued marek's disease herpes virus: protection conferred on strain of chickens varying in genetic resistance. --- Avian Dis. 16: 94-107 (1972)
- 26.- TIZARD, I.R.: Veterinary Immunology. W.B. Saunders Company, - London, Philadelphia, Toronto. 1977
- 27.- TROTT, F.H. de J.: La prueba de HIF para el diagnóstico de brucelosis porcina. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1980
28. WITTER, R.L.: Epidemiology of marek's disease. En: Oncogenesis and Herpesviruses (Edit.by: FIGGS, P.H. and others). 111-122. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1972