

01667

I



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

EVALUACION DEL EFECTO DEL INTERFERON
GAMMA CONTENIDO EN SOBRENADANTES
CRUDOS DE LINFOCINAS CONTRA LA INFECCION
POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE
EN AVES COMERCIALES

2729/60

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS: AVES
PRESENTADA POR:
MVZ JULIO CESAR ALFARO CAMACHO



TUTOR PRINCIPAL: GUILLERMO TELLEZ ISAIAS

COMITE TUTORAL: LUIS PADILLA NORIEGA
JUAN GARCIA GARCIA

MEXICO, D. F.,

ENERO 2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A **Dios**, quien con su gracia me acompaña e inspira en cada momento.

A mis padres **Margarito Alfaro Flores** y **Concepción Camacho Rubio**, cuyo amor y sacrificio han permitido la finalización de mis estudios. Junto con **Dios**, ustedes son mi mayor motivo. Con todo mi amor y respeto.

A mis queridos hermanos **Margarito**, **Martha**, **Ma. Guadalupe**, **José Candelario** y **Ma. Elena**. Espero corresponder en esta forma al amor que me brindan día con día. Este trabajo lo hice por y gracias a ustedes.

A mis queridos sobrinos **Laura Verónica** y **Belem Abigaíl Alfaro Vázquez**; **Martha Isabel**, **Eduardo** y **Carlos Alberto Vilchis Alfaro**; **Carla Miriam** y **Alfredo Martínez Alfaro**; **Marco Antonio** y **Susana Verónica Alfaro del Angel**: porque siempre me contagian de esa alegría inocente con que viven la vida y de quienes tengo mucho que aprender.

A **Gilberta Vázquez Flores**, **Patricia del Angel García**, **Eduardo Vilchis Fuentes**, **Alfredo Martínez Sánchez** y **Miguel Sarabia Pozos**, que me han animado a seguir adelante y por quienes siento un aprecio muy especial.

¡PARA USTEDES CON CARIÑO!

Julio César

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Al Departamento de Producción Animal: Aves

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola

A la Dirección Adjunta de Asuntos Internacionales y Becas, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); y a la Dirección General de estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo de las becas otorgadas para la realización de mis estudios de maestría y del trabajo de tesis.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la FMVZ-UNAM, por el apoyo otorgado en la realización del presente trabajo de tesis. En especial a los doctores Javier Flores Covarrubias y Everardo González Padilla por sus atenciones y disponibilidad.

A la Secretaría de Superación e Intercambio Académico por su mediación en la obtención de las becas de CONACYT y DGEP y en especial a las doctoras Tron, Angélica Dorantes y Rosa María Páramo por sus atenciones y disponibilidad.

A mis asesores Víctor Manuel Petrone García y Gary García Espinoza: por haberme dirigido en el desarrollo de este trabajo, y por la libertad y apoyo que me proporcionaron.

A los doctores Luis Padilla Noriega, Juan García García y Juan Antonio Montaña Hirose, quienes fungieron como parte de mi comité tutorial. Por compartir su tiempo y conocimientos en el mejoramiento de este trabajo, y por la disponibilidad que siempre mostraron para conmigo.

A los doctores del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, especialmente a los doctores Ernesto Ávila González, Ezequiel Sánchez Ramírez, Jaime Esquivel Peña y Elizabeth Posadas Hernández. Por su valiosa contribución y las facilidades que me brindaron para realizar parte de este trabajo en la "Granja Veracruz".

A la doctora **Luz María Charles Noriega**. Por su gran ayuda y su característica alegría.

A **Elizabeth Ábrego**, de quien sólo he recibido cosas buenas. Al Dr **Reyes Cedillo Paz**, un buen amigo al que tengo mucho que agradecerle. A la Sra. **Araceli Mendoza** por su ayuda y enseñanzas. A **Donají García, Edgardo Soriano y Héctor Manzanos**, por su ayuda en clases.

A los doctores **Marco Antonio Juárez Estrada, Xochitl Hernández Velazco y Rubén Merino Guzmán**. Gracias por su apoyo y colaboración en este trabajo. Por el concepto que tienen de la amistad y por confiar en mí como un **amigo**.

Agradezco de manera especial al Técnico **Juan Merino Baranda ("Sr. Juanito")** por la ayuda que me brindó y sus enseñanzas; ha sido un honor haber trabajado y convivido con usted en su sección. Al Técnico **Adelfo Juárez** por su valiosa ayuda; su trabajo fue fundamental, gracias por sus consideraciones. Al Técnico **Rodrigo Merino Baranda** por facilitar mi trabajo y por su amistad. También a...

...la Dra **Felipa Galindo Muñiz**, por su ayuda y por ser mi noble y fiel amiga. ¿Cómo agradecerle? Mil gracias. A ...

El Dr **Gerardo Manuel Nava Morales**. Por haber compartido conmigo sus conocimientos y su cansancio a la par y de manera incondicional de principio a fin. Gracias por todo, principalmente por tu amistad. A ...

El Dr **Tamas Fehervari Bone** por haberme ofrecido la oportunidad de llevar a cabo su idea. Por sus enseñanzas, por todo el tiempo que dedicó a mí y por su amistad. Con admiración y respeto.

Y a una persona que ha resultado fundamental en mi formación profesional, académica y personal: el Dr **Guillermo Téllez Isaías**, mi maestro y amigo. No está por demás mencionar la importancia que tuvo para que este trabajo se realizara. Muchas gracias por su apoyo. Con admiración y respeto.

A todos ustedes ¡Muchas gracias!

JULIO CÉSAR ALFARO CAMACHO. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL INTERFERÓN GAMMA CONTENIDO EN SOBRENADANTES CRUDOS DE LINFOCINAS CONTRA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN AVES COMERCIALES (TUTOR PRINCIPAL: GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS; COMITÉ TUTORAL: LUIS PADILLA NORIEGA, JUAN GARCÍA GARCÍA).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiviral e inmunomodulador de los sobrenadantes de linfocinas denominados SE-ILK (*Salmonella enteritidis*-immune lymphokines) ante un desafío hecho con la cepa velogénica Chimalhuacán del virus de la enfermedad de Newcastle (VENC). Los sobrenadantes se produjeron a partir de cultivos de linfocitos esplénicos (5×10^6 células/ml) de pollos inmunizados con tres dosis de 10^8 ufc/ml de *S. enteritidis* y estimulados *in vitro* con concanavalina-A (7.5 μ g/ml). Se cuantificó el interferón gamma (IFN γ) en los sobrenadantes obtenidos (SE-ILK) mediante un ensayo antiviral *in vitro* empleando cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (1.5×10^5 células/ml) infectados con VENC (100 DICC₅₀/0.1ml). La dilución expresada como log₂ donde se observó completa protección por parte del IFN γ contenido en SE-ILK contra el efecto viral en cultivo celular fue 5 log₂ (1:32). Se probó la hipótesis de que la inyección intraperitoneal de SE-ILK reduciría la severidad de la infección por el VENC en pollos de engorda neonatos libres de anticuerpos a través de la modulación de la respuesta inmune. Los pollos fueron inyectados con 0.5 ml de SE-ILK al día de edad; treinta minutos después fueron desafiados con $10^{7.6}$ DIEP₅₀/ml de VENC. Los resultados obtenidos revelan aspectos interesantes: a) la infección al nacimiento con VENC resultó en ganancia de peso reducida; la aplicación de SE-ILK evitó esta pérdida de peso corporal en forma significativa ($p < 0.05$). b) La administración de SE-ILK disminuyó significativamente la severidad de la infección al inhibir la presentación de signos clínicos ($p < 0.001$), lesiones ($p < 0.005$) y cambios histopatológicos ($p < 0.005$) sugestivos de enfermedad de Newcastle. c) La aplicación de SE-ILK redujo de manera significativa ($p < 0.005$) el aislamiento del VENC a partir de órganos de pollos desafiados; los resultados obtenidos mediante la prueba de aislamiento viral sugieren que el IFN γ presente en SE-ILK evitó la replicación del virus en los tejidos de aves tratadas y mejoró la resistencia. d) Los pollos desafiados-no tratados seroconvirtieron en 2 semanas; en cambio, SE-ILK aceleró e incluso potencializó significativamente ($p < 0.05$) la respuesta primaria por anticuerpos tan solo en 3 días en pollos del grupo tratado. Este estudio proporciona las primeras evidencias de que SE-ILK induce actividades antivirales e inmunomoduladoras similares a las que se han observado con el IFN γ en mamíferos. Hace falta realizar más estudios para determinar si el IFN γ presente en SE-ILK efectivamente es el responsable del efecto protector obtenido.

Palabras clave: linfocinas, interferón gamma, pollos de engorda, *Salmonella enteritidis*, virus de la enfermedad de Newcastle, resistencia, inmunomodulación.

EVALUATION OF GAMMA INTERFERON EFFECTS CONTAINED IN LYMPHOKINE SUPERNATANTS AGAINST NEWCASTLE DISEASE VIRUS INFECTION IN COMMERCIAL BIRDS

Summary

The objective of this study was to evaluate the anti-viral and immune-modulating properties of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines (SE-ILK) against Newcastle disease virus (NDV) by analysis of: A) body weight gain, B) severity of clinical signs, gross pathological and histopathological changes, C) virus isolation rate from organ samples, and D) antibody titres against NDV. Lymphokines from concanavalin-A-stimulated splenic lymphocytes derived from *Salmonella enteritidis*-immune broiler chickens were obtained. The gamma interferon (IFN γ) contained in this supernatant was detected and evaluated in a *in vitro* assay for its ability to induce antiviral resistance in cultures of chicken embryo fibroblasts against the cytopathic effects of NDV. The last SE-ILK log₂ dilution which was associated with cytopathic effects inhibition (1:32) was injected in one-day broiler chicks. Thirty minutes after lymphokines injection the birds were challenged with 10^{7.6} EID₅₀ of NDV. Prophylactic treatment of chickens with SE-ILK resulted in: A) adequate body weight gain (p<0.05), B) significant reduction of clinical signs (p<0.001), macroscopic (p<0.005) and histopathological changes (p<0.005), C) significant reduction in NDV isolation from infected chickens (p<0.005), and D) significant increase on antibody response (p<0.05). These results suggested that the prophylactic administration of SE-ILK induces anti-viral and immune-modulating effects. It might be worth-while to study if IFN γ in SE-ILK is really responsible of the protection obtained.

Key words: Lymphokines, gamma interferon, broiler chickens, *Salmonella enteritidis*, Newcastle disease virus, resistance, immunomodulation.

CONTENIDO

	Página
Capítulo 1	
Revisión bibliográfica	
1.1 Enfermedad de Newcastle	1
1.2 Citocinas. Aspectos generales	5
1.3 Cultivos de linfocitos	8
1.4 Caracterización de citocinas aviares	8
1.5 Uso de SNs de citocinas	10
1.6 INF γ de pollo	11
Capítulo 2	
Introducción	15
Hipótesis	17
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
Capítulo 3	
Material y métodos	
3.1 Elaboración de los SNs de linfocinas	19
3.1.1 Inóculo bacteriano	19
3.1.2 Inmunización de las aves con <i>S. enteritidis</i>	19
3.1.3 Preparación de la suspensión de células esplénicas	20
3.1.4 Aislamiento de linfocitos	20
3.1.5 Incubación de linfocitos	21
3.2 Ensayo antiviral <i>in vitro</i> para detectar y cuantificar IFN γ	22
3.2.1 Cultivos celulares de FEP	22
3.2.2 SNs de linfocinas	22
3.2.3 Inóculo viral	22
3.2.4 Ensayo antiviral	22
3.2.5 Evaluación del ensayo antiviral	23
3.3 Titulación del inóculo viral para la prueba antiviral <i>In vivo</i>	24
3.3.1 Inóculo viral	24
3.3.2 Titulación del inóculo viral de desafío	24
3.4 Prueba antiviral <i>In vivo</i>	24
3.4.1 Aves de experimentación	24
3.4.2 Aplicación de los SNs (SE-ILK y SN testigo)	25
3.4.3 Desafío con VENC	25
3.4.4 Diseño experimental	25
3.5 Evaluación del ensayo <i>in vitro</i>	26
3.6 Evaluación de la prueba <i>in vivo</i>	27
3.6.1 Evaluación de la severidad de la infección por signos y lesiones ..	27
3.6.2 Evaluación de los cambios histológicos	27
3.6.3 Evaluación de la GDP	27
3.6.4 Evaluación del aislamiento del VENC	28
3.6.5 Evaluación de los títulos de anticuerpos contra VENC	28
Capítulo 4	
Resultados	
4.1 Ensayo antiviral <i>in vitro</i> para la titulación de IFN γ	30
4.2 Prueba antiviral <i>In vivo</i>	30
4.2.1 Signos clínicos	30
4.2.2 Lesiones aparentes a la necropsia	31
4.2.3 Cambios histológicos	31

	Página
4.2.4 Ganancia diaria de peso	33
4.2.5 Aislamiento del VENC	33
4.2.6 Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación	33
Capítulo 5	
Discusión	35
Capítulo 6	
Literatura citada	49
Anexos	64
1 Cultivos celulares de FEP	64
2. Titulación del inóculo viral de desafío	64
3. Aislamiento del VENC	65
4. Técnica de inhibición de la hemoaglutinación (HI) procedimiento β ...	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de los títulos de IFN en los distintos tratamientos	68
Cuadro 2. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de signos clínicos	69
Cuadro 3. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante el grado de severidad de signos clínicos	70
Cuadro 4. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de lesiones	71
Cuadro 5. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante el grado de severidad de lesiones	72
Cuadro 6. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de cambios histológicos	73
Cuadro 7. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante el grado de severidad de los cambios histológicos observados	74
Cuadro 8. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 7 de edad	75
Cuadro 9. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 14 de edad	76
Cuadro 10. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 21 de edad	77
Cuadro 11. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante aislamiento del VENC de órganos de pollo infectados	78
Cuadro 12. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de títulos de anticuerpos en pollos infectados con VENC	79

Siglas y abreviaturas empleadas

AV	Aislamiento viral
Con-A	Concanavalina-A
DICC ₅₀	Dosis infectante cultivo celular 50 %
DIEP ₅₀	Dosis infectante embrión de pollo 50%
dsRNA	Double strand ribonucleic acid (cadena doble de ácido ribonucleico)
ENC	Enfermedad de Newcastle
ET-ILK	<i>Eimeria tenella</i> immune lymphokines
FEP	Fibroblastos de embrión de pollo
GDP	Ganancia diaria de peso
HA	Hemoaglutinación
HI	Hemagglutination-Inhibition (prueba de inhibición de la hemoaglutinación)
HN	Hemoaglutinina-Neuraminidasa
ICPI	Intracerebral pathogenicity index (índice de patogenicidad intracerebral)
IFN γ	Interferón gamma
IL-2	Interleucina-2
IVPI	Intravenous pathogenicity index (índice de patogenicidad intravenosa)
kDa	Kilodaltons
LB	Linfocitos B
log ₂	logaritmo base 2
LPE	Libre de patógenos específicos
LT	Linfocitos T
MDT	Mean embryo death time (tiempo promedio de muerte embrionaria)
MHC	Major histocompatibility complex (complejo principal de histocompatibilidad)
PBS	Phosphated buffer solution (solución salina fosfatada buferada)
P-E	Penicilina y estreptomicina
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SE-ILK	<i>Salmonella enteritidis</i> immune lymphokines
SE-ILK _(gpo)	Grupo experimental tratado con SE-ILK pero no desafiado
SE-ILK _{VENC}	Grupo experimental tratado con SE-ILK y desafiado con VENC
SG-ILK	<i>Salmonella gallinarum</i> immune lymphokines

SN	Sobrenadante
SNs	Sobrenadantes
SNT	Sobrenadante testigo
SNT_{VENC}	Grupo experimental tratado con SNT y desafiado con VENC
ssRNA	Single strand ribonucleic acid (cadena sencilla de ácido ribonucleico)
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
T(+)	Grupo testigo positivo (no tratado con SE-ILK, desafiado con VENC)
T(-)	Grupo testigo negativo (no tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC)
ufc	Unidades formadoras de colonia
VENC	Virus de la enfermedad de Newcastle
VEV	Virus de la estomatitis vesicular

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle (ENC) de los pollos es producida por el Paramyxovirus aviar tipo 1. El Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, 1995) clasifica al virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) en el orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Rubulavirus*. Los miembros de la familia *Paramyxoviridae* presentan una envoltura constituida por una doble capa lipídica, la cual toma a partir de membrana plasmática de la célula huésped. Las partículas virales generalmente son esféricas con un diámetro de 150 a 350 nm, pero algunas pueden presentar pleomorfismo; incluso se llegan a observar formas filamentosas. En la envoltura se encuentran insertadas glicoproteínas de origen viral de 8 a 12 nm de longitud, las cuales pueden ser visualizadas por microscopía electrónica (Lamb y Kolakofsky, 1996). El Paramyxovirus aviar tipo 1 se distingue por poseer hemoaglutininas, polipéptidos que permiten a las partículas virales aglutinar eritrocitos de ave; así como una enzima denominada neuraminidasa responsable del efecto de elución (Alexander, 1995). El genoma está constituido por una cadena simple de ácido ribonucleico (single strand ribonucleic acid, ssRNA) no segmentada y de polaridad negativa, la cual está formada por 15,500 nucleótidos aproximadamente y contiene dos regiones extracistrónicas de 50 nucleótidos cada una conocidas como iniciador (3') y finalizador (5'). Entre estas regiones se encuentran ubicados seis genes o secuencias de RNA genómico, las cuales codifican seis polipéptidos virales (Lamb y Kolakofsky, 1996). La electroforesis en gel poliacrilamida de partículas virales purificadas desdobladas, muestra un mínimo de siete polipéptidos para el Paramyxovirus aviar tipo 1. Sin embargo, uno de éstos es la proteína actina del huésped, que se incorpora a la partícula viral (Alexander, 1981). El genoma del VENC codifica seis proteínas: una RNA-transcriptasa y una fosforilasa relacionadas con la nucleocápside; proteína HN (hemoaglutinina-neuraminidasa) causante de las actividades de hemoaglutinación y elución; proteína de fusión F; péptidos NP, formadores de la nucleocápside; y proteína matriz M (Alexander, 1995).

Varias actividades biológicas se vinculan con el VENC. Su capacidad para aglutinar eritrocitos de pollo se debe a la fijación de la proteína HN a receptores presentes en su superficie. Esta propiedad y la inhibición específica de la aglutinación de eritrocitos por antisueros son instrumentos útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 1995). La enzima neuraminidasa forma parte de la molécula HN y está presente en el VENC. Una consecuencia de la presentación de esta enzima es la elución gradual de eritrocitos aglutinados (Alexander, 1989). Sin embargo, se desconoce la función exacta de la neuraminidasa durante el proceso de replicación. Huang *et al* (1980) propusieron que esta enzima actúa en el sitio receptor facilitando la proximidad de la proteína F y la fusión del virus a la membrana celular.

La estrategia de replicación del VENC es similar a la empleada por otros mononegavirus. El paso inicial es la adherencia del virus a receptores específicos celulares, mediada por el polipéptido HN. La fusión de las membranas celular y viral se lleva a cabo por acción de la proteína F, y por consiguiente el complejo nucleocápside penetra a la célula. La replicación tiene lugar por completo en el citoplasma. Debido al sentido negativo que presenta la cadena de RNA, es necesario para la transcriptasa viral generar transcripciones complementarias de sentido positivo que puedan actuar como RNA mensajero (RNAm) y como moldes para genomas virales, así como emplear los mecanismos de la célula para posibilitar la traducción a proteínas. Durante la replicación del VENC se requiere que la glucoproteína precursora FO se desdoble a F1 y F2 para que las partículas virales de la progenie sean infectantes. Esta modificación postraductiva está regulada por proteasas celulares del huésped (Alexander, 1995). Si falla el desdoblamiento, se originan partículas virales no infecciosas. En algunas cepas de VENC, la molécula HN también se produce como un precursor que necesita del desdoblamiento para que sea biológicamente activo (Garten *et al*, 1980). Las proteínas virales sintetizadas en una célula infectada son transportadas cerca de la membrana celular, que se llega a modificar por su incorporación. Siguiendo la alineación de la nucleocápside cerca de las regiones modificadas de la membrana celular, las partículas virales brotan hacia el medio extracelular (Alexander, 1995).

La secuencia de aminoácidos del precursor FO muestra que los virus de baja virulencia tienen una sola arginina más otro aminoácido separado por otros dos en el sitio de desdoblamiento, mientras que los virus virulentos presentan aminoácidos básicos

adicionales que forman dos pares en el sitio (Chambers *et al*, 1986; Glickman, 1988). La presencia de aminoácidos básicos adicionales en cepas virulentas significa que una amplia variedad de proteasas del huésped puede efectuar el desdoblamiento, pero en los virus lentogénicos el desdoblamiento puede suceder sólo con proteasas que reconocen una sola arginina, es decir, enzimas semejantes a la tripsina. Los virus lentogénicos, por lo tanto, sólo se replican en áreas con enzimas semejantes a la tripsina, como los aparatos respiratorio y gastroentérico, mientras que los virus virulentos pueden replicarse en una variedad de tejidos y órganos produciendo una infección sistémica letal (Rott, 1989).

Todos los paramyxovirus aviares se replican en huevos de pollo embrionados, especialmente si provienen de fuentes libres de patógenos específicos (LPE); debido a su eficacia en el crecimiento del virus, y los altos títulos a los cuales se replica en ellos, son utilizados para aislarlo y propagarlo. Las cepas de VENC varían en su capacidad y tiempo requerido para causar muerte embrionaria. Las cepas velogénicas la producen en un periodo menor a 60 horas después de su inoculación; las cepas mesogénicas entre 60 y 90 horas; y aquéllas que la producen después de 90 horas, o ni siquiera la llegan a producir después de 120 horas, son cepas lentogénicas. El VENC puede replicarse en una gran variedad de cultivos celulares (Alexander, 1989). Los efectos citopáticos que produce son, generalmente, formación de sincitios por muerte celular; estos efectos tienen cierta relación con la virulencia de la cepa. La formación de placas en cultivos de células embrionarias de pollo se restringe a virus velogénicos y mesogénicos (Alexander, 1995).

El VENC presenta elevado tropismo por células epiteliales de los tractos respiratorio y gastroentérico, tejido nervioso y células linfoides; son las células blanco del virus el cual se replica activamente en su citoplasma, pudiendo causar su lisis (Alexander, 1995). En el ave, cuando el VENC penetra por conjuntiva ocular o vía respiratoria, infecta células de la mucosa y células linfoides localizadas en la glándula de Harder. Posteriormente el virus se disemina a laringe, tráquea y pulmones; en estos órganos el virus también se replica, alcanzando títulos bastante altos. Después de llegar a los capilares sanguíneos que irrigan estos órganos, el virus es diseminado por todo el organismo en el torrente sanguíneo, produciendo una viremia persistente entre 18 y 24 horas después de la infección. La viremia se mantiene por 4 ó 5 días, tiempo en el cual el virus se ha establecido en diversos órganos como conjuntiva ocular, laringe, tráquea, pulmón, sacos

aéreos, tonsilas cecales, intestino delgado, bazo, bolsa de Fabricio y encéfalo; en todos estos órganos el virus se replica activamente, principalmente en células epiteliales y linfoides. El virus es excretado en heces, aerosoles y/o secreciones nasales. La patogenia del VENC puede variar de acuerdo al patotipo y virulencia de la cepa infectante. Dependiendo de su estado inmunológico y de la virulencia del virus, el ave podrá resistir o sucumbir a la infección (Alexander, 1995; Parede, 1990).

El grado de virulencia del virus está determinado principalmente por la cepa, aunque la dosis, vía de administración, edad y estado inmunológico del pollo, así como diversas condiciones ambientales tienen un efecto importante. En general, entre más jóvenes son las aves la enfermedad es más aguda. Con cepas virulentas en campo, los pollos jóvenes pueden presentar muertes repentinas sin mostrar signos clínicos, mientras que las aves adultas padecen la enfermedad en forma prolongada y con signos clínicos evidentes. Las vías naturales de infección (nasal, oral, ocular) destacan la naturaleza respiratoria de la enfermedad, mientras que las vías experimentales intramuscular, intravenosa e intracerebral aumentan los signos nerviosos (Alexander, 1995). El periodo de incubación del VENC después de la exposición natural varía de 2 a 15 días, aunque en condiciones experimentales presenta un rango de 2 a 6 días dependiendo de varios factores. La velocidad con que se presentan los signos, si los hay, varía dependiendo del virus infectante, edad y estado inmunológico del huésped; infecciones por otros organismos, condiciones ambientales, vía de exposición y dosis. Con cepas muy virulentas la enfermedad puede presentarse de manera repentina, con alta mortalidad en ausencia de otros signos. En brotes ocasionados por el patotipo velogénico viscerotrópico a menudo los signos clínicos comienzan con indiferencia y debilidad, terminando con postración y muerte. Algunas veces se observa diarrea en aves al principio de la infección y antes de morir pueden presentar temblor muscular, torticolis, movimientos opistótonos y parálisis en patas y alas. Bajo condiciones experimentales, la mortalidad puede alcanzar el 100% en parvadas por completo susceptibles. La forma velogénica neurotrópica de la enfermedad puede iniciar con problemas respiratorios, seguidos en 1 ó 2 días por signos neurológicos. La morbilidad puede llegar al 100%; la mortalidad por lo común es menor (Alexander, 1995).

Como los signos clínicos, las lesiones y órganos afectados dependen de la cepa y patotipo del virus infectante, y de factores inherentes al huésped y otros que puedan influir

en la gravedad de la enfermedad. No hay lesiones patognomónicas relacionadas con cualquier forma de la infección; de hecho, las lesiones macroscópicas pueden estar ausentes. La presencia de lesiones hemorrágicas en el intestino de aves infectadas se emplea para distinguir cepas viscerotrópicas de cepas neurotrópicas (Alexander, 1995; Parede y Young, 1990); estas lesiones son prominentes en la forma velogénica viscerotrópica, particularmente en proventrículo, sacos ciegos e intestino delgado; son muy hemorrágicas y resultan de la necrosis en mucosa y submucosa intestinal. Generalmente no se aprecian lesiones macroscópicas en el sistema nervioso central de aves infectadas con VENC sin importar el patotipo (McFerran, 1988). No siempre se observan cambios patológicos macroscópicos en aparato respiratorio, pero cuando están presentes consisten de lesiones hemorrágicas prominentes y congestión marcada en tráquea (Alexander, 1989; 1995).

La respuesta inmune inicial contra el virus es de tipo celular y puede ser detectada en 2 ó 3 días después de la infección con cepas vacunales vivas. Tal vez esto explique la protección temprana contra el desafío que se registra en aves vacunadas antes de tener una respuesta de anticuerpos medible (Alexander, 1995). A pesar de ello la importancia de la inmunidad celular en la protección conferida por las vacunas no está clara. Los anticuerpos dirigidos contra los glucopolipéptidos superficiales funcionales, los polipéptidos HN y F, pueden neutralizar efectivamente al VENC (Russell, 1988). Cuando las aves sobreviven a la infección, los anticuerpos pueden detectarse en suero de 6 a 15 días post-infección. El título depende en gran medida de la cepa infectante. Por lo común, la respuesta máxima se presenta de 3 a 4 semanas post-infección. El decremento de la cantidad de anticuerpos varía con el título obtenido pero la declinación es más lenta que cuando se desarrollan (Alexander, 1995).

1.2 Citocinas. Aspectos generales

La respuesta inmune del ave ante infecciones por microorganismos patógenos es compleja e involucra una gran diversidad de mecanismos humorales y celulares (Lillehoj, 1991). Referente a la inmunidad mediada por células, el desarrollo de una respuesta inmune efectiva implica complejas interacciones entre células hematopoyéticas, linfoides e inflamatorias. Dichas interacciones están mediadas por proteínas solubles de bajo peso molecular y/o glucoproteínas conocidas genéricamente con el nombre de citocinas (Kogut

et al, 1996). Estos mediadores peptídicos están involucrados en varios procesos fisiológicos e inmunológicos, regulando actividades como proliferación, diferenciación y metabolismo celular. Son segregadas por una amplia variedad de células entre las que destacan linfocitos, macrófagos y otras células inmunitarias y no inmunitarias (Klasing, 1994; Kogut *et al*, 1996). Aunque los linfocitos T (LT) y macrófagos son las principales poblaciones celulares productoras de citocinas, otras también son capaces de sintetizarlas (Lillehoj, 1991). Actúan sobre células blanco que poseen receptores de membrana, los cuales son específicos para una citocina dada. Entre sus funciones reguladoras se incluyen el control de la respuesta inmune celular y humoral, inflamación, fiebre, quimiotaxis, respuesta de fase aguda, regresión de tumores, hematopoyesis, actividad antiviral y muchas otras (Kogut *et al*, 1996).

Las citocinas son moléculas pleiotrópicas, por lo que una misma citocina puede inducir diferentes efectos biológicos cuando interactúa con receptores específicos de distintas células blanco, o en una misma célula en diferentes estados de diferenciación, tales como reconocimiento, proliferación y reclutamiento celular. Las citocinas también son redundantes, es decir, varias de ellas pueden inducir el mismo fenómeno en una determinada célula siempre y cuando ésta tenga sobre su superficie receptores específicos para interactuar con ellas. La unión de una citocina a un receptor específico en una célula blanco induce una señal que da como resultado cambios en la activación de la misma y expresión de varios genes. En respuesta a estímulos particulares, subpoblaciones individuales de células inmunes poseen la capacidad de activar genes específicos que codifican para citocinas, lo cual resulta en secreción de más de estas moléculas. Las células y subpoblaciones celulares varían en su expresión de receptores de citocinas individuales y, por lo tanto, difieren en su capacidad de responder a señales de citocinas específicas (Kogut *et al*, 1996).

In vivo, las citocinas trabajan en forma concertada y combinaciones de ellas pueden tener efectos sinérgicos en un tipo celular y antagónicos en otros, lo cual hace que la red de interacciones entre las distintas moléculas sea muy difícil de analizar. En condiciones normales la cantidad de citocinas que se produce es pequeña. Así mismo, el número de receptores específicos en las células que responden es limitado. Sin embargo, la actividad específica de las citocinas es muy elevada; esto aunado a la elevada afinidad de los receptores específicos sobre la superficie de células efectoras, las transforma en

poderosos mecanismos de resistencia. Bajo condiciones normales la cantidad de citocinas producida es pequeña y con una vida media corta, lo que garantiza que sólo células aledañas sean afectadas por estos factores. Con esto se evita la activación indiscriminada de otras células que, de ser activadas, serían responsables de daño, como se observa en algunas patologías. En la mayoría de los casos, las citocinas se han identificado por su efecto en los sistemas biológicos empleados, lo cual ha servido para denominarlas y ha sentado las bases para su detección y cuantificación mediante bioensayos (Kogut *et al*, 1996).

La idea de la existencia de redes de citocinas se ha desarrollado a través de investigaciones sobre la interacción que existe entre poblaciones de células inmunes y no inmunes. Evidencias cada vez más abundantes han demostrado la complejidad de esta cascada de citocinas. Sin embargo, las interacciones funcionales entre citocinas se pueden describir, básicamente, como la respuesta directa de una población de células (células primarias) a estímulos específicos mediante la producción de una citocina particular para ejercer efectos distintos sobre otra población de células (células blanco). Las células blanco responden mediante la producción de citocinas que sirven ya sea como señales de retroalimentación para las células primarias, o bien para iniciar una cascada de eventos, afectando una serie nueva y distinta de células blanco (Kogut *et al*, 1996).

El papel funcional de las citocinas y sus interrelaciones funcionales es crítico para la defensa del huésped y se puede clasificar en tres categorías de la respuesta inmune: 1) *activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos*, lo cual ocurre en respuesta al reconocimiento de antígenos específicos por LT; 2) *hematopoyesis*, la cual estimula el crecimiento y diferenciación de células blasto de la médula ósea, para transformarse en leucocitos maduros; 3) *inflamación*, que está involucrada en la movilización de leucocitos hacia los sitios de infección o lesión tisular. En el pollo se sabe que ocurren estas tres categorías de la respuesta inmune, aun cuando los mecanismos operativos básicos mediadores de ellas todavía no están claros. Se han utilizado citocinas de aves como estimulantes de una respuesta inflamatoria vigorosa en pollos jóvenes, resultando en resistencia de estas aves a infecciones por algunos géneros de microorganismos intracelulares (Kogut *et al*, 1996).

1.3 Cultivos de linfocitos

Los LT y linfocitos B (LB) tienen la capacidad de proliferar *in vitro* cuando son estimulados con agentes mitógenos, incluyendo lectinas, antígenos proteicos solubles y agentes microbianos. Algunos de estos agentes poseen la capacidad de estimular selectivamente LT o LB. Un ejemplo de ello es la estimulación selectiva de LT mediante el uso de concanavalina-A (Con-A). La respuesta proliferativa de linfocitos en cultivo ha sido aprovechada en el estudio de mecanismos celulares y humorales (Lillehoj, 1991). En inmunología aviar han servido como sistemas biológicos empleados para detectar, identificar y cuantificar citocinas.

Cuando son estimulados con antígenos específicos o mitógenos, los cultivos de LT producen *in vitro* moléculas solubles conocidas con el nombre de *linfocinas*. Dichas moléculas son polipéptidos comprendidos dentro del grupo de las citocinas, que presentan poderosos y variados efectos sobre el sistema inmune. Las linfocinas no sólo son importantes en la regulación y diferenciación de células inmunitarias, sino también en la interacción entre estas y otros tipos celulares durante procesos fisiológicos, inflamatorios e inmunológicos (Lillehoj, 1991).

1.4 Caracterización de citocinas aviares

La caracterización molecular de citocinas de ave representa un campo prácticamente nuevo. La secuenciación de proteínas y clonación de genes no se han realizado salvo algunas excepciones (Klasing, 1994). En la mayoría de los casos, la identificación de citocinas aviares se ha basado principalmente en la detección de actividades biológicas y funcionales empleando ensayos *in vitro*, y en la comparación de éstas con sus equivalentes en mamíferos (Lillehoj, 1991).

En humanos y otras especies de mamíferos, la caracterización de varias citocinas ha permitido su clonación molecular (Klasing, 1994). Un ejemplo de ello lo constituye el interferón gamma (IFN γ), ampliamente estudiado en el hombre (Gray y Goeddel, 1982), ratón (Naylor *et al*, 1984) y ovino (Entrican *et al*, 1989). Yip *et al* (1982) determinaron dos formas de proteína glucosilada de IFN γ , con pesos moleculares de 20 y 25 kilodaltons (kDa) y puntos isoeléctricos de 8.3 y 8.5, respectivamente. Estas dos formas parecen ser

producto de un solo gen ubicado en el cromosoma 12 en el humano (Naylor *et al*, 1983) y 10 en el ratón (Naylor *et al*, 1984).

Entre las citocinas aviares caracterizadas, se encuentran dos proteínas solubles con actividades similares a interleucina-2 (IL-2) e IFN γ . Las características bioquímicas del homólogo aviar de IL-2 han sido reportadas por Schauenstein *et al* (1982), y Fredericksen y Sharma (1987), entre otros. Esta molécula se caracteriza como una proteína de 13 kDa capaz de potencializar la proliferación de LT de pollo estimulados con Con-A (Lillehoj, 1991). Otra linfocina con actividad biológica de IFN γ ha sido detectada en sobrenadantes (SNs) de cultivos de LT aviares estimulados con fitohemaglutinina o Con-A (Weiler y von Bulow, 1987; Fredericksen y Sharma, 1987). Algunos investigadores han reportado varias de sus características; otros han intentado su caracterización molecular aunque existen discrepancias en cuanto al peso molecular de la proteína (Dijkmans *et al*, 1990; Fredericksen y Sharma, 1987; Krempien *et al*, 1985; Pusztai *et al*, 1986). Como en el caso del IFN γ humano, la heterogeneidad existente en el peso molecular del IFN γ de pollo (18 a 25 kDa) puede ser debida a diferencias en glucosilación de la molécula, agregación de otras proteínas, o a la formación de dímeros y trímeros bajo ciertas condiciones (Fredericksen y Sharma, 1987; Klasing, 1994; Weiler y von Boulow, 1987).

Recientemente se identificó IFN γ en forma parcial en SNs de linfocitos provenientes de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis* immune lymphokines, SE-ILK) y *Salmonella gallinarum* (*S. gallinarum* immune lymphokines, SG-ILK), estimulados con 2.5 μ g/ml de Con-A. Algunas de sus actividades biológicas fueron detectadas en estos SNs (Gómez, 1995). Los resultados obtenidos en un ensayo de linfoproliferación (García, 1995) determinaron la presencia de IFN γ en un sobrenadante (SN) de LT de aves inmunizadas con *Eimeria tenella* (*E. tenella* immune lymphokines, ET-ILK). Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con 7.5 μ g/ml de Con-A. Mediante citometría de flujo se observó un incremento significativo de moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) en LT. Los resultados de este ensayo evidenciaron indirectamente la presencia de IFN γ al observarse una de sus funciones ya conocidas en mamíferos, como es el incremento de moléculas clase I y II del MHC en LT (Abbas *et al*, 1994; Gerrard *et al*, 1988).

Algunos investigadores han determinado la actividad de otras citocinas empleando modelos experimentales *in vivo*. Byrnes *et al* (1993) estudiaron la actividad del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , por sus siglas en inglés) y del factor estimulador de colonias (CSF) presentes en torrente sanguíneo de pollos infectados con parásitos del género *Eimeria*. Klasing *et al* (1987) determinaron la actividad biológica de interleucina-1 (IL-1) presente en plasma de pollitos infectados con *Salmonella typhimurium*.

1.5 Uso de SNS de citocinas

La manipulación adecuada del sistema inmunocompetente podría considerarse una alternativa para solucionar problemas de origen infeccioso en aves comerciales (Sharma, 1994). En los últimos años, el uso de inmunomoduladores ha generado resultados profilácticos satisfactorios al inhibir o disminuir la severidad de enfermedades causadas por microorganismos intracelulares (McGruder *et al*, 1993; Téllez *et al*, 1993). Entre estos inmunomoduladores destacan las citocinas. Una importante ventaja de estos factores como reguladores de la respuesta inmune del hospedador por encima del tratamiento con vacunas es la aparición inmediata de una respuesta inmune, generada en un período de 24 horas después de su aplicación (Téllez *et al*, 1993). Se ha reportado que la administración exógena de citocinas inicia la secreción y activación de otras, acelerando la respuesta inmune del hospedador (Czuprynski, 1988). Algunos estudios han documentado la administración profiláctica experimental de citocinas derivadas de macrófagos o LT para el tratamiento de infecciones producidas por diversos microorganismos intracelulares. La terapia profiláctica con citocinas puede potencializar tanto la resistencia como la respuesta inmune del ave, inhibir el desarrollo microbiano, acelerar la respuesta protectora y reducir significativamente la severidad de la infección (Gollapudi *et al*, 1988).

Se ha examinado el papel de varias preparaciones de citocinas aviares en la supresión del desarrollo de parásitos del género *Eimeria* (Kogut *et al*, 1988; Kogut y Slajchert, 1992; Lillehoj *et al*, 1989b). Pollos tratados con SNS obtenidos a partir de cultivos de LT estimulados con Con-A, mostraron una disminución significativa del desarrollo intracelular de estos parásitos y de la severidad de la infección. Otros estudios sobre el mecanismo de acción de las citocinas sugieren que son capaces de activar macrófagos y aumentar su actividad fagocítica anticoccidial (Lillehoj *et al*, 1989a).

La aplicación intraperitoneal de SNs de LT procedentes de aves inmunizadas con *S. enteritidis*, *S. gallinarum* y *S. typhimurium*, inhibió la infección causada por estos microorganismos en trabajos realizados con pollos de engorda y pollitas tipo Leghorn de diferentes edades (Kogut *et al*, 1996; McGruder *et al*, 1993; Ray *et al*, 1993; Téllez *et al*, 1993; Wong, 1996). Al igual que éstos, otros estudios han investigado el efecto producido por SNs de citocinas administrados en aves comerciales ante infecciones por diversos microorganismos bacterianos y parasitarios (Kogut y Slajchert, 1992; Lillehoj *et al*, 1989b; Téllez *et al*, 1993). La administración intraperitoneal de citocinas parece ser hasta ahora la única vía efectiva para estimular la respuesta inmune del ave. No se ha observado efecto alguno cuando son administradas en forma intramuscular o subcutánea. La máxima eficacia de los SNs se observa cuando son administrados en dosis que van de 0.1 a 0.5 ml, hasta 48 horas antes del desafío (García, 1995), lo que no sucede si son administrados 12 horas después del mismo (Kogut y Slajchert, 1992).

Existe una respuesta inespecífica y eficaz en el hospedador originada por la inyección de citocinas. La resistencia generada contra la infección por microorganismos intracelulares como *Salmonella* y *Eimeria*, está asociada con la potencialización de la respuesta inflamatoria (Kogut y Slajchert, 1992; Téllez *et al*, 1993). Esta protección es el resultado de un incremento concomitante de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica y de una infiltración importante de estas células inflamatorias en los sitios de infección (Téllez *et al*, 1993). Los LT a menudo han sido necesarios para la completa expresión de la inmunidad mediada por fagocitos (Kogut, 1996). A pesar de éstos y otros estudios realizados con el objetivo de comprender los mecanismos de acción relacionados con los SNs de citocinas, poco se sabe sobre los factores que se encuentran presentes.

1.6 IFN γ de pollo

El IFN γ es una glucoproteína comprendida dentro del grupo de las linfoquinas. Es sintetizado por LT presentes en el torrente sanguíneo y tejidos linfoides una vez estimulados con antígenos específicos, mitógenos o aloantígenos. Los LT que expresan antígenos CD4 y CD8 son capaces de sintetizar IFN γ , aunque los primeros son considerados los principales productores en respuesta a antígenos virales (Harvell *et al*, 1982); existe evidencia que sugiere que los LB son capaces de producirlo en pequeñas

cantidades (Hirt *et al*, 1978). En condiciones naturales el IFN γ es sintetizado y segregado por estas células después de una infección viral, bacteriana o parasitaria (Breed, 1997; Byrnes, 1993; Harvell *et al*, 1982; Leiby, 1993; Suzuky, 1988). Los virus cuyo genoma está constituido por RNA, y en especial los de doble cadena (double strand ribonucleic acid, dsRNA) son altamente eficaces en estimular su síntesis (Ito *et al*, 1982). Al ser secretado, el IFN γ es capaz de unirse a receptores de membrana de otras células del organismo e inducir un estado antiviral. Frente a muchos virus, la resistencia de las células animales se incrementa notablemente por efecto del IFN γ (Stryer, 1991). Los interferones (α , β y γ) desarrollan este estado antiviral a través de la producción de dos enzimas: una denominada proteína quinasa y otra 2,5-oligo A sintetasa. Estas enzimas se activan en presencia de dsRNA. La proteína quinasa activada interfiere en la formación de nuevas cadenas polipeptídicas, y la 2,5-oligo A sintetasa activada conduce a la destrucción de moldes de RNAm y componentes del RNA ribosomal en la maquinaria de síntesis de proteínas. Estas dos acciones de común acuerdo con el dsRNA bloquean la replicación del virus (Fenner, 1974; Grossberg, 1987; Stryer, 1991; Revel, 1979). Los interferones son muy potentes; una concentración tan baja como 10^{-11} M tiene un efecto antiviral significativo (NIAID y WHO, 1980; Grossberg, 1987).

El homólogo aviar del IFN γ también induce un estado de resistencia celular antiviral. Esta actividad se ha observado únicamente en ensayos *in vitro*, basados generalmente en la habilidad del IFN γ para proteger cultivos celulares contra los efectos citopáticos de algún virus, por lo común de origen no aviar. El procedimiento de rutina empleado para determinar la actividad del IFN γ de pollo, depende de su habilidad para proteger cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) contra la infección por el virus de la estomatitis vesicular (VEV) [Buscaglia y Calnek, 1988; Lillehoj, 1991]. El grado de inhibición de replicación viral está relacionado directamente con la potencia de la preparación de IFN γ . Esto es, el grado por el cual diluciones de una preparación de IFN γ son capaces de proteger células de un tipo particular contra la infección productiva de un cierto tipo de virus (Lillehoj, 1991).

El IFN γ de pollo presenta otros efectos reguladores sobre diversos tipos celulares, tales como activación y diferenciación de macrófagos y otras células inmunitarias (Pusztal *et al*, 1986). Kagaya *et al* (1989), y Ovington *et al* (1995) han propuesto que las funciones del IFN γ son principalmente inmunomoduladores. Se ha reportado que en cultivos de células

esplénicas se incrementa la liberación de IFN γ después de la infección con parásitos intracelulares (Breed *et al*, 1997; Martin *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989). Algunos estudios realizados con diferentes concentraciones de Con-A (2-40 μ g/ml) y diferentes concentraciones celulares de LT aviares (1×10^7 ; 2×10^7 /ml) reportan que el IFN γ posiblemente es la linfocina que se encuentra en mayor concentración en los SNs obtenidos de estos cultivos [Adair *et al*, 1991; Breed *et al*, 1997; Dijkmans *et al*, 1990; Kaspers *et al*, 1994; Kogut y Lange, 1989 (a, b); Prowse y Pallister, 1989; Revel, 1979; Weiler y Von Bulow, 1987(a, b)].

Kogut y Slajchert (1992) han determinado la presencia de IFN γ en ET-ILK, mediante su desnaturalización al tratar el SN a 56 °C durante 30 minutos, u 80 °C durante 10 minutos en condiciones bajas de pH (pH 2), o bien, con tripsina. Debido a que el IFN γ es termolábil, estas condiciones son las que se requieren para determinar su presencia (Dijkmans *et al*, 1990; Kogut y Slajchert, 1992; Paul, 1993). La desnaturalización de IFN γ permite diferenciarlo del IFN termoestable tipo I (α , β), que es segregado *per se* en cultivos celulares donde existen células epiteliales o endoteliales [Grossberg, 1987; Kogut y Slajchert, 1992; Weiler y von Bulow, 1987 (b)]. Kaspers *et al* (1994) obtuvieron un SN de LT esplénicos de pollo estimulados *in vitro* con Con-A a una dosis de 10 μ g/ml. A partir de este SN purificaron parcialmente IFN γ , el cual intervino en el aumento de expresión de moléculas clase II del MHC en monocitos de pollo. Además, en un ensayo *in vitro* este SN protegió cultivos celulares infectados con un agente viral de origen no aviar. Algunos autores han verificado que al estimular cultivos de LT de aves *in vitro* con Con-A, el SN obtenido tiene un efecto antiviral importante, posiblemente debido a la presencia de IFN γ .

De alguna forma, estos estudios han permitido determinar la presencia de IFN γ en este tipo de SNs mediante la detección de sus actividades biológicas. Cabe señalar que se han realizado ensayos antivirales *in vitro* empleando IFN sintetizado en cultivos de células de origen embrionario (fibroblastos de pollo principalmente) y algún virus de origen no aviar, o incluso VENC. Sin embargo, ningún estudio se ha realizado con la finalidad de determinar el papel que desempeñan el IFN γ y otras linfocinas *in vivo* ante una infección de origen viral exclusiva de aves. En este estudio se investigará si el IFN γ se encuentra presente en los productos solubles de linfocitos estimulados con Con-A, procedentes de

pollos inmunizados con *S. enteritidis*; así como el efecto del tratamiento profiláctico con SE-ILK sobre la severidad de la infección producida por el VENC en pollos de engorda sin experiencia inmune contra este agente. El estudio contribuye a la detección del IFN γ en SE-ILK. Específicamente permite determinar si el sobrenadante SE-ILK induce algún efecto antiviral *in vivo*.

CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN

Debido al papel regulatorio que presentan las citocinas en una variedad de procesos fisiológicos e inmunológicos, los cuales son fundamentales en producción avícola (Kogut *et al*, 1996), su aplicación en parvadas de pollos comerciales podría justificarse. Las citocinas son proteínas biológicamente activas que regulan un gran número de funciones fisiológicas y juegan un papel importante en la resistencia y modulación del sistema inmune (Howard *et al*, 1993; Kogut *et al*, 1996). El papel que desempeñan incluye regulación de intensidad en la respuesta inmune humoral, celular e inflamatoria, y determinación del tipo de respuesta que predomina después de un desafío (Klasing, 1994). Varias de ellas regulan sistemas fisiológicos incluyendo reparto de nutrientes y apetito (Klasing y Johnstone, 1991). Otras participan en mecanismos de resistencia (Kuby, 1997). El equilibrio existente entre estas actividades se refleja básicamente en el estado de salud del organismo (Klasing y Johnstone, 1991).

En medicina veterinaria existen situaciones en las que es deseable inducir resistencia, o bien, aumentar la capacidad del ave para desarrollar una respuesta inmune ante enfermedades inmunodepresoras. La inmunodepresión originada en parvadas de pollos comerciales suele ocasionar pérdidas económicas a la industria. Estas parvadas generalmente experimentan un pobre desarrollo corporal y una elevada susceptibilidad ante patógenos oportunistas (Tizard, 1996). Varios agentes infecciosos, particularmente los virus, son causa de inmunodepresión severa (Sharma *et al*, 1996). El entendimiento de la biología de las citocinas podría permitir su uso para optimizar la resistencia de las aves y manipular en forma adecuada el sistema inmunocompetente ante infecciones de tipo viral.

El tratamiento con citocinas exógenas ha mostrado potencializar la respuesta inmune en modelos animales. Recientemente se ha examinado la posibilidad de su uso en aves de corral para evitar el impacto negativo de infecciones por agentes bacterianos y parasitarios intracelulares. La administración de SNs de citocinas obtenidos a partir de cultivos de linfocitos activados con Con-A promueve la proliferación de distintas poblaciones de leucocitos en sangre periférica y la infiltración de las mismas en los sitios

de infección por los microorganismos intracelulares *S. enteritidis*, *S. gallinarum* y *E. tenella*. Se ha inferido que la protección observada en estos estudios pudo ser modulada por citocinas con efecto quimiotáctico y activador de poblaciones de granulocitos, linfocitos y/o monocitos (Kogut *et al*, 1988; Kogut y Slajchert, 1992; Téllez *et al*, 1993; Wong, 1996). Sin embargo, hasta ahora sólo se tiene la certeza de que IL-2 e IFN γ se encuentran presentes en estos SNs (Gómez, 1995).

En la última década ha aumentado el interés en la caracterización y clonación de citocinas aviares; también se han realizado estudios para entender su posible papel inmunomodulador. De particular interés ha sido el estudio de IFN γ de pollo (Sharma, 1996). El IFN γ es una linfocina que juega un importante papel modulador en la resistencia y en la inmunidad (Dijkmans *et al*, 1990; Howard *et al*, 1993). En el hombre y otros mamíferos ha sido usado como agente terapéutico contra ciertos tipos de infecciones y cánceres (Douglas *et al*, 1985; Higgins *et al*, 1986, 1988; Quesada y Gutterman, 1987; Tizard, 1996). Su principal mecanismo de acción ha sido estudiado en infecciones de tipo viral (Gresser, 1990; Howard *et al*, 1993). Este factor induce un importante efecto antiviral al bloquear el proceso de replicación del virus limitando de esta forma la infección (Joklik, 1990).

Teóricamente, la administración profiláctica de IFN γ y otras citocinas de pollo en aves comerciales debe promover resistencia ante infecciones virales. En el presente estudio se elaboró un cultivo de linfocitos de bazo de pollos inoculados con *S. enteritidis* y estimulados con un agente mitógeno. Se cuantificó el IFN γ contenido en el SN obtenido de los cultivos de linfocitos (SE-ILK) mediante un ensayo antiviral en cultivos de FEP. Se empleó como referencia un INF de pollo purificado. La última dilución protectora de SE-ILK contra la replicación del VENC en cultivo celular fue aplicada intraperitonealmente en pollitos neonatos. Se examinó el efecto de su aplicación sobre la severidad de la infección en pollos de engorda libres de anticuerpos. Se probó la hipótesis de que la inyección intraperitoneal de SE-ILK podría resultar en protección de aves *in vivo* y reducir el impacto negativo de la infección por VENC. El objetivo fue evaluar el efecto de su aplicación ante un desafío hecho con una cepa velogénica del VENC, mediante: a) prevención de la presentación clínica de la enfermedad; b) análisis de la ganancia diaria de peso; c) disminución en la tasa de aislamiento del virus a partir de órganos de aves tratadas; y d) análisis de la respuesta de anticuerpos contra el VENC en pollos infectados.

HIPÓTESIS

La aplicación intraperitoneal de un SN de linfocinas obtenido de cultivos de linfocitos de aves inmunizadas con *S. enteritidis* y activados con Con-A (SE-ILK), inhibe o disminuye la severidad de la infección producida por una cepa velogénica de VENC en pollos de engorda libres de anticuerpos contra ENC.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antiviral e inmunomodulador de SE-ILK ante la infección producida por una cepa velogénica de VENC en pollos comerciales libres de anticuerpos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la severidad de la infección producida por una cepa velogénica de VENC mediante la observación de signos clínicos y lesiones de la enfermedad en pollos de engorda tratados con SE-ILK.
- Evaluar el efecto antiviral e inmunomodulador de SE-ILK mediante el análisis de la ganancia diaria de peso (GDP) en pollos de engorda infectados con una cepa velogénica de VENC.
- Evaluar el efecto antiviral de SE-ILK mediante el aislamiento de VENC a partir de órganos de pollos de engorda infectados con una cepa velogénica.
- Evaluar el efecto inmunomodulador de SE-ILK sobre la respuesta humoral mediante el análisis de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en pollos de engorda infectados con una cepa velogénica de VENC.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Elaboración de los SNs de linfocinas

3.1.1 Inóculo bacteriano. Para la inmunización de las aves en la obtención de SE-ILK se empleó un aislamiento primario de *S. enteritidis* fagotipo 13 procedente del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (National Veterinary Services Laboratory) en Ames, Iowa, y aprobado por el Servicio de Inspección de Sanidad Fitopecuaria (Animal and Plant Health Inspection Service) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture) para su uso en laboratorio. Fue seleccionado por su resistencia a novobiocina y ácido nalidíxico y mantenido en agar nutritivo. El medio utilizado (caldo tetrionato) para cultivar el aislamiento (24 horas a 37 °C) contenía 25 µg/ml de novobiocina y 20 µg/ml de ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de otras bacterias. Los inóculos para la inmunización con *S. enteritidis* fueron preparados en solución salina fosfatada buferada estéril (PBS, por sus siglas en inglés). Mediante espectrofotometría se determinó la turbidez del inóculo equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colonia (ufc)/ml. Se verificó la concentración de células viables del inóculo mediante siembra por estría y posterior conteo de colonias en placas de agar verde brillante con 25 µg/ml de novobiocina y 20 µg/ml de ácido nalidíxico.

3.1.2 Inmunización de las aves con *S. enteritidis*. Se utilizaron 20 pollos de engorda comerciales estirpe Hubbard x Hubbard procedentes de una incubadora comercial (Cuernavaca, Morelos; México). Fueron recibidos al día de edad en una unidad de aislamiento* y alojados en baterías con calefacción eléctrica (Petersime Broot-Unit; Petersime Incubator Company. Gettysburg Ohio USA). Se les proporcionó una ración balanceada de iniciación para pollo de engorda (22% de PC y 3000 Kcal de EM/Kg, sin anticoccidiano) y agua *ad libitum* durante el tiempo que duró el proceso de inmunización. Diez de los pollos fueron inoculados oralmente con 10⁸ ufc/ml de *S. enteritidis*, a los 14, 21 y 28 días de edad. Se

* Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

mantuvieron pollos no infectados como grupo testigo bajo condiciones similares en un edificio de aislamiento separado y fueron inoculados de igual manera con PBS estéril (1 ml/ave). Tres días después de la última inmunización, las aves fueron sacrificadas mediante la aplicación de émbolo gaseoso (10 cm³ de aire/pollo) en la vena radial del ala. Se empleó una técnica convencional de necropsia (Zander y Mallinson, 1995) para obtener los bazos. El proceso de inmunización de las aves con *S. enteritidis*, la obtención de células de bazo, el aislamiento de linfocitos y la preparación de los SNs de linfocinas, se realizaron mediante la técnica descrita por Kogut y Slajchert (1992), y Téllez *et al* (1993).

3.1.3 Preparación de la suspensión de células esplénicas. Los bazos de pollos inmunizados experimentalmente con *S. enteritidis* y de los testigos no infectados, se pasaron a través de una criba del número 50 de acero inoxidable para tejidos (Bellco Inc. Vineland, NJ) utilizando solución balanceada de Hank's (HBSS; Sigma Chemical St Louis MO). Las células esplénicas se juntaron y centrifugaron a 250 x g, durante 10 minutos a 4 °C (Sorvall RT 6000). El botón celular fue suspendido en una solución tampón de lisis (NH₄Cl 0.15 M; KHCO₃ 1.0 mM) para eliminar eritrocitos. Posteriormente las células fueron sometidas a dos lavados con HBSS. Se realizó una dilución 1:25 en medio frío RPMI 1640 y se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se preparó una sola suspensión celular (6 x 10⁶ células/ml) en medio RPMI 1640 libre de suero, adicionado con L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), 2-mercaptoetanol (5 x 10⁵ M), penicilina y estreptomycin (P-E) (Lakeside, Laboratories USA). Las células testigos se prepararon a partir de bazos de pollos no inmunizados, siguiendo la misma metodología.

3.1.4 Aislamiento de linfocitos. Las suspensiones celulares a partir de bazos preparadas con anterioridad, se pasaron a través de columnas de fibra de nilón mediante el método descrito por Julius *et al* (1973), y adaptado por Kogut y Slajchert (1992), para la purificación de linfocitos. A fin de realizar la purificación de linfocitos a partir de la población de células de bazo, los macrófagos fueron eliminados al incubar la suspensión celular en cajas de Petri plásticas de 100 x 15 mm (FALCON® 1029 Becton Dickinson USA), a 37.5 °C durante 2 horas en una incubadora con ambiente humidificado y 5% de CO₂ (12.0 ml de suspensión por

caja). Las células no adherentes (linfocitos) contenidas en el sobrenadante se decantaron de las cajas de Petri. Posteriormente estas células no adherentes se pasaron a través de columnas de fibra de nilón. Las columnas fueron preparadas previamente con fibra de nilón (Fenwal Laboratories, Morton Grove, IL) a razón de 3.5 g, introduciéndola sin compactarla, en jeringas de 35 cc. Posteriormente fueron esterilizadas en autoclave (15 libras/pulgada², 121.6 °C, 15 minutos). Las columnas fueron preincubadas con medio RPMI 1640 tibio adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO® Laboratories), a 37.5 °C por una hora y 5% de CO₂. Se pasaron a través de las columnas 3 x 10⁸ células contenidas en 10 ml de medio RPMI 1640. Hecho lo anterior se incubaron nuevamente a 37.5 °C durante dos horas y 5% de CO₂. Las células no adherentes a la fibra de nilón fueron eluidas de la columna con medio RPMI 1640 tibio (37.5 °C). Las células eluidas se lavaron con este medio y se determinó su viabilidad mediante tinción excluyente de azul de tripan al 0.1% (trypan blue stain; Life Technologies Grand Island NY USA). Se ajustó la densidad celular a la concentración deseada (5 x 10⁶ células viables/ml) con medio RPMI 1640 libre de suero más P-E. El aislamiento de los linfocitos testigos se efectuó a partir de células de bazos de pollos no inmunizados, mediante el mismo método. Estas suspensiones celulares se utilizaron en la preparación de los SNs.

3.1.5 Incubación de linfocitos. Los SNs se obtuvieron mediante la incubación de las suspensiones de linfocitos purificados (5 x 10⁶ células/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con 7.5 µg/ml de Con-A, 2-mercaptoetanol (5 x 10⁵ M), L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E, en cajas de cultivo celular (Nunc 50 ml) durante 48 horas, a 37.5 °C y 5% de CO₂ (Wieler y von Bulow, 1987). El SN testigo fue preparado de manera similar, incubando las células no adherentes a la fibra de nilón, procedentes de pollos no inmunizados (cultivo y aislamiento simultáneo). Después de la incubación, los SNs se colectaron y centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos para remover células remanentes. Con la finalidad de inactivar residuos de Con-A se adicionó metil-α-mannopyranosida (40 µg/ml; Sigma Chemicals St Louis MO). Los materiales centrifugados se pasaron a través de filtros con poros de 0.45 µm. Los productos obtenidos [SE-ILK y SN testigo (SNT)] fueron almacenados en refrigeración a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.2 Ensayo antiviral *in vitro* para detectar y cuantificar IFN γ

3.2.1 Cultivos celulares de FEP. Los cultivos celulares de FEP utilizados en el ensayo antiviral *in vitro* fueron elaborados a partir de embriones de pollo LPE de 9 días de edad, de acuerdo a la técnica descrita por Sekellick y Marcus (1986), con las modificaciones hechas por Shat y Purchase (1989) [Anexo 1].

3.2.2 SNs de linfocinas. Se emplearon los SNs de linfocinas obtenidos anteriormente para tratar los cultivos de FEP.

3.2.3 Inóculo viral. Se utilizó una cepa velogénica de VENC (cepa Chimalhuacán) para determinar la presencia de IFN γ en los SNs evaluados. Dicha cepa fue proporcionada por el QBP Alejandro Méndez (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional). El virus fue cosechado en embriones de pollo LPE. Se inoculó a un título constante en los cultivos de FEP previamente tratados con los SNs. De acuerdo a la técnica descrita por Shat y Purchase (1989) se efectuaron las diluciones requeridas para obtener un título de 100 dosis infectante cultivo celular 50% / 0.1ml (100 DICC₅₀/0.1ml).

3.2.4 Ensayo antiviral. Para determinar la presencia de IFN γ en los SNs de linfocinas se empleó un ensayo antiviral *in vitro*, en el cual se utilizaron diluciones dobles seriadas a partir de los SNs originales y la cepa Chimalhuacán de VENC a un título constante. En una placa de cultivo celular de 96 pozos (Nunc F96) con 100 μ l/pozo de RPMI 1640 sin suero, se agregaron 100 μ l/pozo del SN original denominado SE-ILK en los 3 primeros pozos de la primera línea; del pozo 4 al 6 se agregaron 100 μ l/pozo del SNT; del pozo 7 al 9 se agregaron 100 μ l/pozo de IFN de pollo de referencia;^{*} y del décimo al duodécimo pozo se agregaron 100 μ l/pozo de RPMI 1640 sin suplementar. A partir de ahí se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la dilución 1:256 (Breed *et al*, 1997; Prowse y Pallister, 1989). Posteriormente 100 μ l de cada pozo y de cada dilución se transfirieron a una placa homóloga de cultivo celular (Nunc F96) que contenía una cantidad estandarizada de FEP. De esta placa donde se hallaba establecido el monoestrato celular, el

^{*} 80 UI/ml; 1st Int Ref Prep Inter Chick 67/18, WHO International Laboratory for Biological Standard / National Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hamstead, London Nw3 6 RB, England

medio fue removido; se agregaron 100 μ l/pozo de MEM sin suero para lavar por una ocasión las células, reemplazándolo posteriormente con 100 μ l/pozo de las respectivas diluciones de SE-ILK, SNT, IFN de pollo de referencia y RPMI 1640 sin suplementar. El ensayo se repitió en 10 placas. Los FEP tratados se dejaron incubar a 37 °C durante 24 horas y 5% de CO₂ (Kaspers *et al*, 1994; Martin *et al*, 1994). Al término de la incubación los tratamientos fueron removidos de cada placa y las células se lavaron dos veces con MEM sin suero. Después, en cada pozo se agregaron 100 μ l de una dosis constante de VENC previamente estandarizada (100 DICC₅₀ / 0.1 ml) [Agarwal *et al*, 1996; Kohase *et al*, 1986; Shat y Purchase, 1989]. Cuando el testigo negativo de cada placa (columnas 10, 11 y 12) presentó efecto citopático, se realizó la evaluación mediante calificación del efecto citopático del VENC empleado. Los cultivos se dejaron 48 horas más en incubación según lo descrito por Castañón (1974). Al término de este periodo y con el fin de determinar el efecto citopático, las placas fueron examinadas visualmente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases.

3.2.5 Evaluación del ensayo antiviral. Las células viables y las que mostraron efecto citopático fueron determinadas según lo descrito por Dijkmans *et al* (1989, 1990), Martin *et al* (1994), y Rubinstein *et al* (1981). El título de IFN contenido en el sobrenadante SE-ILK se determinó en logaritmo base 2 (\log_2), de acuerdo al procedimiento empleado para la titulación del testigo positivo que contiene IFN γ de pollo diluido a una concentración de 80 UI/ml (preparación 67/18, National Institute for Biological Standards and Control, Hamstead, Londres), el cual protege consistentemente hasta la dilución 6 \log_2 contra los efectos citopáticos inducidos por 100 DICC₅₀ del VEV, cepa Indiana (Dijkmans *et al*, 1990; Martin *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989). Los resultados se reportaron como el título de IFN obtenido a partir de la dilución \log_2 en la que el SE-ILK mostró 100% de protección sobre la muestra celular contra el efecto del VENC (dilución 5 \log_2 = 1:32). El título de IFN contenido en el SE-ILK evaluado se expresó como un promedio de las 10 réplicas realizadas (Kaspers *et al*, 1994; Martin *et al*, 1993; Prowse y Pallister, 1989). El título de INF contenido en SE-ILK fue de 1:32 (dilución 5 \log_2). Para evaluar las diferencias entre los grupos tratados, se utilizó un análisis de varianza con los datos transformados como raíz cuarta del \log_2 (Gill, 1978). Para valorar las diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados se empleó la

prueba de Duncan por medio del paquete estadístico SAS® [Statistical Analysis System] (Luginbuke y Schlotzhaver, 1987); se estipuló un nivel de significancia para α de $p < 0.05$.

3.3 Titulación del inóculo viral para la prueba antiviral *in vivo*

3.3.1 Inóculo viral. Se utilizó la misma cepa velogénica de VENC (cepa Chimalhuacán) empleada para determinar la presencia de IFN γ en SE-ILK.

3.3.2 Titulación del inóculo viral de desafío. Se analizó la infectividad de la muestra de VENC cepa Chimalhuacán, mediante determinación del punto final de la dosis que infecta el 50 por ciento de embriones (DIEP₅₀, dosis infectante embrión de pollo, 50%) contenida en las ampollas de siembra de trabajo (1.5 ml). Estas ampollas fueron obtenidas a partir de la matriz de siembra original. Para ello, se calculó la cantidad de virus mediante el método de Spearman-Kärber (Allan *et al.*, 1980) [Anexo 2], la cual fue de $10^{7.6}$ DIEP₅₀/ml.

3.4 Prueba antiviral *in vivo*

3.4.1 Aves de experimentación. Se usaron 200 pollos de engorda de la estirpe Hubbard x Hubbard de un día de edad, procedentes de una parvada de reproductoras pesadas cuyo calendario de inmunización no incluía vacunación contra ENC. Quince semanas previas a la obtención del lote de aves experimentales, la parvada de reproductoras no recibió vacunación alguna contra ENC. Siete días antes de la incubación de los huevos fértiles se midió el nivel de anticuerpos de las reproductoras contra VENC mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Hemagglutination-Inhibition, HI). Las aves resultaron negativas. La incubación de los huevos fértiles se llevó a cabo en una incubadora comercial (Cuernavaca, Morelos, México). Al nacimiento, los pollos fueron agrupados aleatoriamente y alojados en baterías de 5 niveles con calefacción eléctrica, ubicadas en unidades de aislamiento.* Las aves empleadas como testigos negativos fueron colocadas por separado en otra batería. Todos los pollos

* Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

recibieron alimento y agua *ad libitum* durante el tiempo que duró el estudio. El alimento proporcionado consistió en una ración balanceada de iniciación para pollo de engorda (22% de PC y 3000 Kcal de EM/Kg de alimento, sin anticoccidiano). Antes de la inoculación del virus se midió el nivel de anticuerpos de los pollos contra VENC mediante la prueba de HI. Todas las aves resultaron negativas o con títulos de anticuerpos de 1:2.

3.4.2 Aplicación de los SNs (SE-ILK y SN testigo). La dilución expresada como \log_2 donde se observó completa protección por parte del IFN γ contenido en SE-ILK contra el efecto viral en cultivo celular (dilución $5 \log_2 = 1:32$) fue inyectada intraperitonealmente en pollitos de engorda de un día de edad. De igual forma se inyectó el SN testigo sin diluir en las aves del grupo correspondiente.

3.4.3 Desafío con VENC. Se utilizó una dosis única de desafío ($10^{7.6}$ DIEP₅₀/0.1 ml/pollo) de la cepa velogénica Chimalhuacán. El desafío fue hecho media hora después de la aplicación de los SNs, mediante inyección intramuscular en el muslo de los pollos.

3.4.4 Diseño experimental. Se emplearon 200 pollos de engorda de un día de edad, los cuales fueron agrupados en forma aleatoria en 5 grupos de 40 aves. Los grupos quedaron conformados de la siguiente manera: el primer grupo fue el tratado con SE-ILK pero no desafiado (SE-ILK); el segundo grupo fue el tratado con SE-ILK y desafiado con VENC (SE-ILK_{VENC}); el tercer grupo fue el tratado con SNT y desafiado con VENC (SNT_{VENC}); el cuarto grupo fue el testigo positivo [no tratado-desafiado, T(+)], y un quinto grupo que fue el testigo negativo [no tratado-no desafiado, T(-)].

Al día de edad, las aves de los cinco grupos fueron pesadas con una balanza electrónica en forma individual; los pesos fueron registrados por grupo y se obtuvo el promedio. Se obtuvieron muestras de sangre de 5 pollos por grupo; se extrajo 1.0 ml de sangre por ave mediante punción en la vena yugular para obtener suero y determinar niveles de anticuerpos mediante la prueba serológica de HI. Ese mismo día, los pollos de los grupos tratados con SE-ILK (grupos 1 y 2) fueron inyectados con 0.5 ml vía intraperitoneal empleando jeringas de insulina (1 ml).

Los pollos del grupo 3 fueron tratados de igual manera con SNT. El desafío de las aves se realizó 30 minutos después de la aplicación de los SNs (grupos 2, 3 y 4); los pollos desafiados fueron inyectados en el muslo izquierdo con una dosis única de VENC ($10^{7.6}$ DIEP₅₀/0.1 ml/pollo). Al día 3 de edad, 10 pollos de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical para realizar aislamiento viral (AV) a partir de muestras de órganos (tráquea, pulmón, encéfalo y tonsilas cecales). De 2 aves por grupo se tomaron muestras de encéfalo, bazo, timo, bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, proventrículo y tráquea para estudio histopatológico. Las aves restantes de cada grupo fueron pesadas a los 7, 14 y 21 días de edad, para calcular la GDP en cada uno de esos días. También se obtuvieron muestras de sangre (2.0 ml) de 5 aves por grupo para realizar estudio serológico. Diez pollos de cada grupo fueron sacrificados para realizar AV a partir de muestras de los órganos mencionados. Se tomaron muestras de órganos de 2 aves por grupo para histopatología. Los cambios patológicos observados a la necropsia fueron reportados. Durante el transcurso del diseño experimental se registró diariamente (2 veces al día) la presentación de signos clínicos y/o mortalidad debido a la infección por el VENC. Se tomaron muestras de órganos para AV de aquellas aves que presentaron signos clínicos de la enfermedad inmediatamente después que murieron.

3.5 Evaluación del ensayo *in vitro*

Se utilizaron las lecturas del ensayo antiviral por medio del título de INF en \log_2 . Para evaluar las diferencias entre los grupos tratados, se realizó un análisis de varianza empleando el procedimiento de los Modelos Generales Lineales (The General Linear Models) con los datos transformados como raíz cuarta del \log_2 (Gill, 1978). Para valorar las diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados se empleó la prueba de rango múltiple de Duncan por medio del programa comercial de análisis estadístico SAS® [Statistical Analysis System] (Luginbuke y Schlotzhaver, 1987; Zar, 1996). Se estipuló un nivel de significancia para α de $p < 0.05$.

3.6 Evaluación de la prueba *in vivo*

3.6.1 Evaluación de la severidad de la infección por signos y lesiones. Para determinar la severidad de la infección producida por la cepa velogénica Chimalhuacán de VENC, las aves fueron observadas diariamente (por la mañana y en la tarde) durante el periodo de estudio. Los signos clínicos observados fueron registrados por grupo a partir de su presentación y divididos en respiratorios, digestivos y nerviosos. Las lesiones y cambios aparentes a la necropsia en cada uno de los muestreos (días 3, 7, 14 y 21) fueron registrados de igual manera; las lesiones se clasificaron de acuerdo a su grado de severidad en leves, moderadas y severas. La mortalidad fue reportada en registros diarios y fue considerada como un signo clínico más. Se utilizó la prueba de Ji-cuadrada para determinar diferencias estadísticas significativas entre los grupos, respecto a la presencia de lesiones y signos clínicos (Zar, 1984).

3.6.2 Evaluación de los cambios histológicos. Muestras de órganos (encéfalo, bazo, timo, bolsa de Fabricio, tonsilas cecales, proventrículo y tráquea) de 2 pollos por grupo en cada día de muestreo fueron colectadas y procesadas mediante la técnica convencional de inclusión en parafina, cortadas a 4 μ m de espesor y coloreadas con la tinción de Hematoxilina-Eosina, según lo descrito por Luna (1968). Los cambios microscópicos fueron descritos y agrupados por órgano de acuerdo al grado de severidad y distribución. Se utilizó la prueba estadística de Ji-cuadrada para determinar diferencias significativas entre los grupos, respecto a la presencia de cambios histológicos en los órganos evaluados (Zar, 1984).

3.6.3 Evaluación de la GDP. La evaluación del tratamiento profiláctico con SE-ILK se llevó a cabo mediante el análisis de la GDP. Las aves fueron pesadas al día de edad y en cada uno de los días correspondientes al calendario de muestreo. Previo al sacrificio, la totalidad de las aves fue pesada en ayuno utilizando una balanza electrónica digital. Las aves fueron pesadas en forma individual y los pesos fueron registrados por grupo. Se obtuvo el peso promedio por grupo en cada uno de los días designados y se calculó la GDP en cada periodo de muestreo empleando la siguiente fórmula:

$$GDP = \frac{\text{Peso promedio del grupo hasta el día de muestreo} - \text{Peso promedio del grupo al día de edad}}{\text{número de días comprendidos desde el día de edad hasta el día de muestreo}}$$

Se analizaron las diferencias en la GDP entre grupos de aves mediante análisis de varianza, empleando el procedimiento de los Modelos Generales Lineales (The General Linear Models). Las diferencias estadísticas de medias entre grupos se precisaron utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan, mediante el programa comercial de análisis estadístico SAS® [Statistical Analysis System] (Luginbuke y Schlotzhaver, 1987).

3.6.4 Evaluación del aislamiento del VENC. En cada uno de los días correspondientes al calendario de muestreo establecido (días 3, 7, 14 y 21) diez pollos de engorda fueron sacrificados para obtener muestras de cada ave de encéfalo, pulmón, tráquea y tonsilas cecales. Para evaluar el efecto antiviral del tratamiento profiláctico con SE-ILK en aves infectadas con VENC, se realizó la técnica de inoculación y aislamiento del virus a partir de muestras de órganos, descrita por Allan *et al* (1980) y Alexander (1989), con las modificaciones necesarias para este estudio (Anexo 3). Los resultados obtenidos en el aislamiento viral fueron registrados por ave y por grupo diariamente. Se utilizó la prueba de Ji-cuadrada para determinar diferencias estadísticas significativas entre grupos, respecto a la tasa de infección por el VENC (Zar, 1984).

3.6.5 Evaluación de los títulos de anticuerpos contra VENC. Se obtuvieron muestras de sangre de 5 aves por grupo en los días 1, 7, 14 y 21. Se extrajo 1 ml de sangre por ave mediante punción en vena yugular, en aves de 1 día de edad. A los 7, 14 y 21 días de edad, se obtuvieron 3 ml de sangre por ave mediante punción intracardiaca. Con el fin de evaluar el efecto del SE-ILK sobre la inmunidad humoral, se analizaron los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en suero de pollos infectados con una cepa velogénica del VENC. Para ello se realizó la técnica de HI, procedimiento β (suero diluido-virus constante) descrita por Beard (1989) [Anexo 4]. El título de anticuerpos se expresó como el recíproco de la última dilución del suero que inhibió completamente la capacidad hemoaglutinante del virus. Con los datos obtenidos se realizó una

transformación logarítmica y se obtuvo la media geométrica de los títulos de anticuerpos por grupo y por día de muestreo. Para determinar si existía diferencia estadística significativa entre medias, a los resultados se les aplicó análisis de varianza empleando el procedimiento de los Modelos Generales Lineales (The General Linear Models). Las diferencias estadísticas de medias entre grupos se determinó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan, utilizando el programa comercial de análisis estadístico SAS® [Statistical Analysis System] (Luginbue y Schlotzhaver, 1987).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Ensayo antiviral *in vitro* para la titulación de IFN γ

El título de IFN γ contenido en SE-ILK fue de 1:32 (dilución 5 log₂); en el SNT fue de 1:2 (dilución 1 log₂); y el título de IFN de referencia observado fue de 1:64 (dilución 6 log₂). El título de IFN γ obtenido a partir de la dilución log₂ en la que el SE-ILK mostró 100% de protección sobre la muestra celular contra el VENC, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al observado en el SN de aves no inmunizadas con *S. enteritidis* (SNT). No se observó diferencia significativa entre el título del IFN de referencia y el título de IFN γ contenido en SE-ILK. En resumen, SE-ILK expresó niveles significativos de IFN γ *in vitro* (Cuadro 1).

4.2 Prueba antiviral *In vivo*

4.2.1 Signos clínicos. Los pollos de los grupos SE-ILK (tratado con SE-ILK pero no desafiado) y T(-) [no tratado-no desafiado] no desarrollaron signos clínicos. Por el contrario, la totalidad de aves del grupo T(+) [no tratado-desafiado] desarrollaron signos de tipo inespecífico (depresión, deshidratación, emaciación, postración, letargia y muerte) después de un periodo de incubación de 3 días; la presentación de signología nerviosa (convulsiones clónicas continuas, temores esporádicos, torticolis y movimientos opistótonos) al día 12 post-desafío en más del 50% de los pollos puso en manifiesto el tropismo del virus. La mortalidad se presentó exclusivamente del tercer al sexto día post-desafío [15 pollos (37.5%)]; varias de las muertes ocurrieron en forma repentina. Los pollos que desarrollaron signos nerviosos no se recuperaron; sin embargo no murieron. No se observaron signos respiratorios ni digestivos. El curso clínico de la enfermedad fue similar en pollos del grupo SNT_{VENC} (tratado con SNT y desafiado con VENC); los signos nerviosos también fueron similares y 21 pollos (52.5%) los presentaron. A pesar del IFN γ detectado en el SNT, clínicamente el material obtenido no confirió resistencia a los pollos contra VENC. En contraste, la cantidad de IFN γ presente en SE-ILK confirió resistencia significativa ($P < 0.001$) en pollos tratados ante el VENC. Un solo pollo (2.5%) del grupo SE-ILK_{VENC} (tratado con SE-ILK y desafiado con VENC) presentó

tortícolis y convulsiones clónicas, pero no hubo mortalidad. En resumen, se observó reducción significativa ($P < 0.001$) de signos clínicos en el grupo SE-ILK_{VENC} en comparación con el grupo T(+) [Cuadros 2 y 3].

4.2.2 Lesiones aparentes a la necropsia. En aves de los grupos T(+) y SNT_{VENC} se observó aumento de volumen moderado y congestión leve en bazo y bolsa de Fabricio al día 7 post-desafío. Entre los 14 y 21 días se observó consistentemente el aumento de volumen en estos órganos; algunos pollos mostraron edema y congestión leve en el encéfalo al día 21. Los cambios más evidentes en encéfalo ocurrieron en aves que presentaron los signos nerviosos más severos. No se presentaron lesiones en los tractos respiratorio y digestivo, excepto hemorragias petequiales leves en el proventrículo de algunos pollos. No se observaron cambios patológicos en los grupos SE-ILK, SE-ILK_{VENC} y T(-) durante la fase experimental. En resumen, la inhibición de lesiones en el grupo SE-ILK_{VENC} fue significativa ($P < 0.001$) [Cuadros 4 y 5].

4.2.3 Cambios histológicos. Los cambios histopatológicos descritos a continuación estuvieron presentes en pollos de los grupos T(+) y SNT_{VENC}, con grado de severidad similar (Cuadro 7). Estos cambios fueron más aparentes a partir del día 14 post-desafío. En términos generales consistieron en: a) focos de necrosis difusos y degeneración celular de leve a severa en encéfalo, bazo, timo, epitelio traqueal y de proventrículo, bolsa de Fabricio y tonsilas cecales. b) Formación de centros germinales en timo, bolsa de Fabricio, tonsilas cecales y bazo. Por órgano, los cambios fueron:

Encéfalo. Se observó endoteliosis e infiltración linfocitaria perivascular de moderada a severa en corteza del encéfalo después del día 14. También se apreciaron algunos focos de necrosis y meningitis.

Bazo. Se observaron consistentemente hiperplasia nodular y formación de centros germinales los días 7, 14 y 21 después del desafío, así como un marcado incremento de células dendríticas y linfoblastos en los centros germinales. Se observó acúmulo de células linfoides periarteriales y focos de necrosis difusos en la corteza a partir del día catorce.

Timo. Depleción linfocitaria leve en la zona cortical al día 7. Se observó atrofia moderada de la corteza al día 14 y severa al 21, e hiperplasia de células reticulares en la médula. Una necrosis de células linfoides con el mismo grado de severidad correspondió con la atrofia los días 14 y 21.

Bolsa de Fabricio. Se observó depleción linfocitaria de leve a moderada los días 14 y 21. Los mismos folículos presentaron infiltración de macrófagos de moderada a severa en esos días; especialmente en estos días, el órgano se observó hiperémico y edematoso, con pocos linfocitos y una gran cantidad de macrófagos. El órgano presentó focos de necrosis de linfocitos en la corteza de los folículos y degeneración focal del epitelio.

Tonsilas cecales y proventrículo. Fue común una marcada hiperplasia de células linfoides en tonsilas cecales con formación de centros germinales diseminados en submucosa. Ocurrió un incremento de macrófagos al día 14 y siguió hasta el 21. Cambios similares estuvieron presentes en mucosa, submucosa y epitelio glandular del proventrículo; células dendríticas y linfoblastos estuvieron presentes en los centros germinales. Algunas aves mostraron infiltración heterofílica en submucosa. Ocasionalmente se observaron cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos en células del epitelio glandular.

Tráquea. El daño en mucosa traqueal consistió de necrosis focal en células epiteliales y desciliación leve en algunas zonas del epitelio; se apreció infiltración heterofílica moderada en submucosa los primeros días, seguida de infiltración linfocitaria ligera.

En pollos de los grupos SE-ILK y SE-ILK_{VENC} uno de los cambios histológicos en órganos linfoides (bolsa de Fabricio, timo, bazo, tonsilas cecales) consistió en formación de centros germinales a partir del tercer día. Probablemente el principal cambio fue el marcado incremento de macrófagos en centros germinales de bazo y en médula de los folículos de bolsa de Fabricio. La corteza de los folículos de bolsa de Fabricio, así como la corteza de timo y bazo, contenían una marcada población de células linfoides; la médula mostró infiltración de células

mononucleares. Fue común una infiltración leve de granulocitos en submucosa de las tonsilas cecales, proventrículo y tráquea los días 3 y 7. No se apreciaron cambios degenerativos en los órganos evaluados. Ningún cambio histológico se observó en aves del grupo T(-). En resumen, se observó inhibición significativa ($P<0.005$, $P<0.001$) de cambios degenerativos en el grupo SE-ILK_{VENC} en comparación con el grupo T(+) [Cuadros 6 y 7].

4.2.4 Ganancia diaria de peso. Los días 7, 14 y 21 post-desafío se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los promedios de GDP de los grupos SE-ILK, SE-ILK_{VENC} y T(-) con respecto a los grupos SNT_{VENC} y T(+). No se apreció diferencia significativa entre los grupos SE-ILK, SE-ILK_{VENC} y T(-); tampoco entre los grupos SNT_{VENC} y T(+). La GDP del grupo SE-ILK_{VENC} fue significativamente mayor ($P<0.05$) a la del grupo T(+) [Cuadros 8, 9 y 10].

4.2.5 Aislamiento del VENC. En el grupo SE-ILK_{VENC} se observó una disminución significativa ($p<0.005$) en la cantidad de pollos infectados con VENC, en comparación con el grupo T(+). No se apreció diferencia entre los grupos SNT_{VENC} y T(+). En el grupo SE-ILK_{VENC}, en 3 de 40 pollos (7.5%) se aisló el VENC; en el grupo SNT_{VENC}, en 37 de 40 pollos (92.5%); y en el grupo T(+), en 39 de 40 pollos (97.5%). No se aisló el virus a partir de órganos de pollos de los grupos SE-ILK y T(-) durante el periodo experimental. El Cuadro 11 muestra que en el grupo SE-ILK_{VENC} se obtuvo un alto porcentaje de protección al desafío. Se muestra diferencia significativa ($p<0.005$) entre este grupo y el grupo T(+).

4.2.6 Títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación. La respuesta por anticuerpos en los distintos grupos tratados al día de edad se aprecia en el Cuadro 12, donde se presenta la media geométrica del inverso del título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y la desviación estándar en los cinco grupos. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los promedios de anticuerpos de los distintos grupos de aves al primer día de edad, antes de la aplicación de los tratamientos. Las aves provenían de la misma incubadora y de una parvada sin inmunización reciente contra ENC, por lo que las medias de anticuerpos maternos fueron bajas y estadísticamente similares al día de edad. Al día 7 post-desafío se observó diferencia significativa ($p<0.05$) entre la

media de anticuerpos del grupo SE-ILK_{VENC} con la de los demás grupos, incluyendo el T(+). No se observó diferencia significativa entre las medias de los grupos SNT_{VENC} y T(+). Los días 14 y 21 post-desafío se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos SE-ILK_{VENC}, SNT_{VENC} y T(+); y entre cada uno de éstos con los grupos SE-ILK y T(-). No se observó diferencia significativa entre los promedios de estos dos grupos. Se puede resumir que la respuesta serológica a los tratamientos con SE-ILK fue muy variable; ésta fue mayor en el grupo SE-ILK_{VENC} que en los grupos SE-ILK y SNT_{VENC} únicamente en los primeros siete días post-desafío. Después de este día disminuyó notablemente. En todo caso, el grupo SE-ILK_{VENC} difirió significativamente ($p < 0.05$) de estos dos grupos, y de los testigos (+) y (-). Los títulos de anticuerpos séricos no difirieron significativamente entre los grupos SNT_{VENC} y T(+), y SE-ILK y T(-), pero sí entre ellos (Cuadro 12).

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Numerosos agentes no virales como bacterias, hongos, parásitos y micobacterias, o sus productos, son capaces de inducir la producción de IFN en una amplia variedad de cultivos celulares incluyendo fibroblastos, macrófagos, LT, LB, células endoteliales y epiteliales; generalmente en menor cantidad a la inducida por virus (Raj y Pitha, 1980). Las infecciones con *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Eimeria tenella* han dado resultados positivos para estimular la producción de IFN γ en cultivos de linfocitos y en modelos *in vivo* (Breed *et al*, 1997; Byrnes *et al*, 1993; García, 1995; Gómez, 1995; Merigan, 1978). En el caso específico de *S. enteritidis*, niveles significativos de IFN γ han sido obtenidos a partir de esplenocitos de pollos infectados (Gómez, 1995). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales microorganismos diferentes a los virus pueden activar la maquinaria celular para la síntesis de IFN. Otro importante grupo de inductores de IFN γ comprende varios activadores metabólicos, entre ellos los denominados mitógenos (Reem *et al*, 1982). Es necesario el uso de mitógenos como auxiliares *in vitro* en la estimulación de linfocitos previamente sensibilizados *in vivo*.

Con el fin de obtener niveles aceptables de IFN γ en SE-ILK, se eligió una densidad de linfocitos sensibilizados con *S. enteritidis* (5×10^6 células/ml) mayor a la reportada por Téllez *et al* (1993). Para conseguir tal densidad se utilizaron pollos mayores de tres semanas y se efectuaron mezclas celulares de varios de ellos. Paradójicamente, se ha observado que con densidades de 1×10^7 células/ml o mayores, la síntesis de IFN γ tiende a ser baja (Prowse y Pallister, 1989). Por los resultados observados *in vitro* y la cantidad de IFN γ obtenida (1:32) se puede considerar que la densidad celular utilizada fue la adecuada. Los linfocitos cultivados *in vitro* mueren en pocas horas si no son estimulados con agentes mitógenos como fitohemaglutinina o Con-A, o con aloantígenos específicos (Breed *et al*, 1997; Prowse y Pallister, 1989). Para asegurar la viabilidad de los linfocitos y su activación, se utilizó Con-A a razón de 7.5 $\mu\text{g/ml}$. Esta dosis potencializó favorablemente la estimulación *in vivo* de los esplenocitos con *S. enteritidis*, así como la síntesis de IFN γ .

Las células normales, como regla, no sintetizan IFN mientras no sean estimuladas; todas las evidencias disponibles indican que esto se debe a la ausencia de transcripción de los genes que codifican esta citocina. Su transcripción, sin embargo, puede ser propiciada por una variedad de inductores entre los que destacan virus dsRNA y los ya mencionados activadores metabólicos, entre ellos los mitógenos (Kuby, 1997). Los inductores de IFN más importantes son los virus. En general, los virus con genoma de RNA son los mejores inductores, mientras que los virus con genoma de DNA, con excepción de los Poxvirus, son malos inductores; todos los virus dsRNA son excelentes inductores de IFN γ , incluyendo el dsRNA de los reovirus y las formas replicativas de virus ssRNA (Field *et al*, 1970; Lai y Joklik, 1973). La cinética de producción de IFN γ inducida por mitógenos como Con-A tiende a ser similar a la producida por virus RNA: la síntesis empieza 4 horas después de la estimulación y alcanza su máximo a las 24 horas (Joklik, 1990). Los linfocitos aislados de bazo o de sangre responden a Con-A proliferando, pero únicamente los linfocitos estimulados previamente *in vivo* con algún agente infeccioso son capaces de producir IFN γ en cantidades adecuadas (Breed *et al*, 1997; Prowse y Pallister, 1989). De acuerdo a la cinética de síntesis inducida por Con-A y para obtener SE-ILK con mayor contenido de IFN γ , se aumentó a 48 horas el tiempo de incubación de linfocitos estimulados con Con-A, en lugar de las 24 horas consideradas como óptimas (Prowse y Pallister, 1989; Weiler y Von Bulow, 1987b).

Se obtuvo un bajo nivel de IFN γ de linfocitos de aves no inmunizadas *in vivo* pero sí estimulados con Con-A (1:2); este título ayudó a determinar un nivel basal, el cual se empleó como referencia y permitió hallar diferencias significativas con relación al título de IFN γ de linfocitos de aves inmunizadas con *S. enteritidis*. En un estudio reciente se investigó la cinética de producción de IFN γ por linfocitos de sangre periférica de pollos infectados con una dosis única de *E. tenella*; la actividad biológica del IFN γ se manifestó hasta el octavo día post-infección (Breed *et al*, 1997). En el presente estudio la actividad de IFN γ en cultivo celular así como el título obtenido, se detectaron al tercer día de la última de varias inmunizaciones repetidas con *S. enteritidis*; es decir, se contó con un programa de refuerzo inmunológico para favorecer la formación de memoria. Los LT de memoria requieren de pocas horas de estimulación con mitógenos para proliferar *in vitro* y sintetizar IFN γ , no así LT sin experiencia inmune (Iezzi *et al*, 1998). Estos últimos requieren de 48 horas como mínimo para sintetizar cantidades apenas detectables de

IFN γ ; en contraste, los LT de memoria secretan cantidades considerablemente mayores después de 2 horas de incubación con algún agente inductor (Bachmann *et al.*, 1999).

Se ha informado que el VEV presenta características únicas de sensibilidad y especificidad para detectar y cuantificar IFN γ presente en SNs de cultivos de fibroblastos o linfocitos (Revel, 1979; Rubistein *et al.*, 1981). Debido a ello se considera el agente de elección. Sin embargo su uso está restringido debido a que este virus produce en los bovinos una enfermedad clínicamente similar a la fiebre aftosa, que es exótica para México. Considerando este factor se buscó evaluar la actividad antiviral *in vitro* del IFN γ de pollo frente a un virus de ave por especificidad de especie. Se planteó utilizar el VENC, un virus ssRNA cuyo efecto citopático pudo ser bloqueado adecuadamente por IFN γ . El ensayo antiviral empleado como sistema de detección y cuantificación utilizando un virus de ave aportó resultados positivos y satisfactorios.

La mayoría de los trabajos que han evaluado SNs de linfocitos estimulados *in vitro* con Con-A no reportan efectos tóxicos de las citocinas en cultivos de FEP. A pesar que es factible que concentraciones elevadas de proteína los produzcan, en este estudio no existió ningún tipo de interferencia en la evaluación visual del efecto citopático del VENC en las últimas diluciones de SE-ILK; y en las primeras diluciones el monoestrato de FEP se observó íntegro en cada una de las réplicas realizadas. Una caja de cultivo celular fue tratada por separado con SE-ILK sin diluir y no se observó efecto tóxico sobre los FEP (datos no mostrados). Se puede concluir que el efecto citopático observado en las últimas diluciones de SE-ILK se debió exclusivamente al VENC utilizado.

La síntesis de linfocinas derivadas de LT es un elemento clave en la generación de respuestas inmunes *in vivo*; entre estas linfocinas se encuentra IFN γ (Howard *et al.*, 1993). Los interferones presentan muchos y variados efectos biológicos; entre ellos actividad antiviral, regulación del crecimiento celular, multiplicación y/o inhibición de poblaciones celulares, inmunomodulación, aumento en la expresión de moléculas del MHC, aumento en la actividad de células citotóxicas (NK, natural killer), inhibición de algunas actividades de biosíntesis celular y la amplificación de otras (Vilcek y Sen, 1996). La base molecular de todas estas actividades es el hecho de que los interferones inducen la transcripción/expresión de una amplia variedad de genes. Las proteínas codificadas por estos genes efectúan varias funciones que van desde la inducción del estado antiviral

hasta la activación de la transcripción de otros genes que regulan las habilidades celulares de proliferación, diferenciación y comunicación (Vilcek, 1979).

Tan pronto como fue descubierto el IFN, se intentó explotar su potente efecto antiviral y sus propiedades inmunorreguladoras en casos clínicos humanos. Varios estudios al respecto se han realizado en las dos últimas décadas (Billiau, 1981; Czarniecki *et al*, 1984; Douglas *et al*, 1985; Higgins *et al*, 1986; Monto *et al*, 1986; Strander *et al*, 1987). Los primeros estudios fueron diseñados para aprovechar su actividad antiviral. También se han hecho reportes de su uso terapéutico en especies de mamíferos (Tizard, 1996) pero no en pollos u otras aves de corral. No todos los estudios reportan resultados favorables del tratamiento con IFN γ sobre el sistema inmune en humanos y animales experimentales. Dependiendo de la dosis y tiempo de administración, IFN γ puede activar o suprimir la inmunidad humoral y celular. Se ha mencionado que la administración *in vivo* de IFN γ antes de o junto con antígenos virales tiene considerables efectos inmunosupresivos; sin embargo, dosis bajas después de la infección aumentan (mientras dosis altas suprimen) las respuestas celular y humoral. El IFN γ preexistente puede interferir con la respuesta inmune y contribuir con los efectos inmunosupresivos comúnmente observados en las infecciones virales (Friedman, 1988). Se ha reportado que la administración exógena de IFN γ y la inducción de IFN γ endógeno durante el curso de una infección viral suprimen las respuestas inflamatorias locales contra bacterias gram negativas (Heremans, 1987).

Resulta difícil inferir hasta qué grado es posible comparar los mecanismos inmunes de los mamíferos con los de las aves. Si bien los mecanismos de resistencia y aquéllos involucrados en las respuestas humorales y celulares comparten mucha similitud, existen diferencias que son fundamentales. A diferencia de lo reportado por Friedman (1988) en humanos, los pollos tratados con IFN γ contenido en SE-ILK no sólo resistieron a la infección con una cepa virulenta de VENC, sino también se apreció el efecto inmunomodulador del SN al potencializar la respuesta humoral. Por consiguiente, la administración intraperitoneal de SE-ILK treinta minutos antes del desafío viral no tuvo ningún efecto inmunosupresivo ni detrimental en pollitos neonatos. La ausencia del cuadro clínico y cambios histológicos sugestivos de ENC, así como el peso adecuado de los pollos durante la fase experimental es reflejo de ello.

En este estudio se reporta: a) la actividad antiviral e inmunomoduladora de SE-ILK en un modelo experimental *in vivo* con pollos de engorda, ante un virus específico y común de aves explotadas comercialmente, y b) la eficacia del tratamiento profiláctico con SE-ILK en la inhibición de los efectos inmunodepresores y detrimentales producidos por el virus causante de la ENC en pollos.

Como se esperaba en este estudio, los pollos del grupo T(-) no desarrollaron signos clínicos y se mostraron saludables. Por el contrario, aves del grupo T(+) infectadas con VENC desarrollaron signos clínicos después de un periodo de incubación de 3 días. Si bien la mayoría de los signos fueron de tipo inespecífico (depresión, deshidratación, emaciación, postración, letargia y muerte), la presentación de signología nerviosa al día 12 post-desafío en más del 50% de los pollos, y la ausencia de signos respiratorios y digestivos pusieron de manifiesto el tropismo de la cepa viral usada. Se ha informado que la forma respiratoria de la enfermedad es más frecuente en infecciones por cepas lentogénicas y mesogénicas (Cheville *et al*, 1972).

El curso clínico de la enfermedad fue similar en pollos del grupo tratado con SNT; los signos nerviosos fueron similares y el 52.5% de los pollos los presentaron. A pesar del IFN γ detectado en el SN de linfocitos de aves no inmunizadas pero sí estimulados con Con-A (1:2), clínicamente el material obtenido no confirió protección a los pollos contra la infección por VENC; obviamente, este título basal fue insuficiente para proteger contra el desafío. Se ha informado que linfocitos aislados de bazo responden a Con-A proliferando, pero únicamente aquellos estimulados previamente *in vivo* con algún agente infeccioso son capaces de producir IFN γ en cantidades adecuadas (Breed *et al*, 1997; Prowse y Pallister, 1989).

Los linfocitos de pollos estimulados con dosis repetidas de *S. enteritidis* e incubados con Con-A, fueron capaces de sintetizar una cantidad significativamente mayor de IFN γ . El título contenido en SE-ILK (1:32) confirió resistencia significativa ante el desafío con VENC. A diferencia del grupo T(+), un solo pollo del grupo SE-ILK_{VENC} presentó tortícolis y convulsiones clónicas. Se ha sugerido que muchos de los síntomas clínicos observados en casos de infecciones respiratorias virales tratadas con IFN en humanos pueden ser potencializados por la toxicidad de este último (Quesada y Gutterman, 1987). En el

transcurso de este estudio no se observaron efectos tóxicos que pudieran ser atribuidos a SE-ILK con su contenido de INF.

Los pollos tratados con SE-ILK pero no desafiados, no desarrollaron signos clínicos sugestivos de ENC; tampoco mostraron efectos de toxicidad por el título de IFN γ contenido en este SN aplicado intraperitonealmente (1:32). Históricamente, varios procesos fisiopatológicos en humanos y algunas especies de animales han sido tratados con citocinas (Howard, 1993). Mientras que IFN γ contribuye positivamente con las defensas del hospedador en varios modelos de enfermedades infecciosas, en algunas situaciones ha tenido consecuencias indeseables en la generación de niveles tóxicos de TNF α . Esto se ha mostrado claramente en modelos animales con malaria cerebral, donde el IFN γ exagera vía TNF α la patología de la enfermedad y anticuerpos anti-IFN γ la disminuyen (Grau *et al*, 1989). La aplicación de dosis excesivas de citocinas para obtener altas concentraciones séricas por tiempo prolongado, se asocia con toxicidad severa (Howard, 1993). Se ha observado que sobredosis de IFN en ratones resulta en esterilidad del macho debido a atrofia testicular (Hekman *et al*, 1987). El éxito del IFN γ como agente antiviral en humanos ha sido cuestionado debido a que la aplicación de niveles elevados a pacientes se asocia con fiebre, dolor de cabeza, anorexia, fatiga, malasia, náuseas, vómito y deposición de complejos inmunes en riñón (Durum y Oppenheim, 1993; Howard, 1993); toxicidad renal, cardíaca y del sistema nervioso central (Quesada *et al*, 1986; Quesada y Gutterman, 1987). Terapias prolongadas pueden al mismo tiempo resultar en leucopenia, disfunción hepática, fatiga crónica, toxicidad gastroentérica y neurológica, hipotensión y disfunción del miocardio (Quesada y Gutterman, 1987). Prácticamente todos los interferones usados en estudios clínicos humanos son interferones recombinantes. Parece ser, sin embargo, que los diferentes lotes de IFN recombinante poseen actividad clínica variable (Quesada y Gutterman, 1987). Debido a ello, se han reportado en algunos casos varios de los efectos tóxicos ya descritos.

Por lo observado en este estudio se puede considerar que la terapia profiláctica con SE-ILK no sólo disminuye significativamente el cuadro clínico producido por una cepa velogénica de VENC; también resulta inocua a la dosis administrada para pollitos recién nacidos. Los resultados obtenidos revelan dos aspectos interesantes: a) anteriormente no se habían realizado estudios *in vivo* sobre la actividad antiviral de linfocinas de pollo empleando un agente viral específico de aves comerciales. b) La administración de SE-

ILK en pollitos de engorda de un día de edad ha mostrado ser inocua y efectiva en el tratamiento profiláctico para prevenir la presentación de signos y lesiones sugestivas de ENC. A pesar de la ausencia del cuadro clínico de la enfermedad en pollos tratados con SE-ILK y desafiados, no significa que la infección celular y la replicación viral no puedan ocurrir.

Varios cambios histopatológicos fueron observados en las muestras de órganos del grupo T(+) y del grupo SNT_{VENC}. La formación de centros germinales y degeneración focal de células reticuloendoteliales, linfoides y epiteliales fueron los cambios microscópicos más sobresalientes. Estas lesiones corresponden con aquéllas reportadas en infecciones por cepas virulentas de VENC. Es interesante hacer notar que a pesar de la ausencia de signos respiratorios y digestivos en los pollos, algunos cambios histopatológicos fueron apreciados en proventrículo, tonsilas cecales y tráquea. La destrucción focal y desciliación en varias zonas del epitelio traqueal sugieren que la replicación del virus alcanzó títulos significativos y que estuvo asociada con daño en mucosa de la tráquea a pesar del desafío intramuscular. El efecto citolítico del virus descrito por Lam y Vasconcelos (1994) se manifestó con la necrosis observada en la mayoría de los órganos evaluados, incluyendo encéfalo. La replicación del VENC suele ocasionar depleción de tejidos linfoides. El mecanismo exacto de depleción se desconoce, aunque evidencias histopatológicas han permitido determinar que el VENC es linfocida por sí mismo (Lam y Vasconcelos, 1994). En todo caso la destrucción de tejido linfoide fue evidente y significativa no sólo en el grupo T(+); también lo fue en el grupo tratado con SNT. Debido a las lesiones observadas en pollos de este último grupo, es posible determinar que el SN obtenido de aves no inmunizadas con *S. enteritidis* no contiene el material biológicamente activo (IFN γ u otra linfocina o linfocinas) necesario para evitar el daño histológico inducido por el VENC.

Se observó un incremento significativo en la resistencia al daño histológico por el VENC conferido por SE-ILK. De acuerdo con los cambios celulares en los tejidos evaluados, parte de esta resistencia pudo estar asociada con un incremento significativo de células linfoides, macrófagos y granulocitos en bazo, timo y bolsa de Fabricio. A diferencia del grupo T(+), en los grupos tratados con SE-ILK los centros germinales se presentaron desde el tercer día; es decir, la reacción celular fue más rápida. Debido a sus características pleiotrópicas y redundantes, varias citocinas al igual que IFN γ inducen la

diferenciación y proliferación de distintas poblaciones de leucocitos (Paul, 1989). Si es necesario, la proliferación y diferenciación de leucocitos puede ser sumamente explosiva dependiendo de los estímulos y factores involucrados (Parry *et al*, 1988). Órganos linfoides como timo y bolsa de Fabricio proporcionan lugares adecuados para la maduración y transformación de linfoblastos en células inmunológicamente competentes. Para que esto ocurra, éstos órganos al igual que el bazo tienen la función de capturar antígenos y proporcionar sitios de interacción entre células linfoides y antígenos procesados por fagocitos. De esta forma se activa la proliferación clonal de distintas poblaciones y subpoblaciones de LT y B, y se lleva a cabo su diferenciación a células efectoras (Kuby, 1997). En este estudio, no sólo IFN γ pudo haber estimulado la proliferación de células linfoides, macrófagos, células dendríticas y granulocitos en órganos linfoides y otros tejidos, sino la posible presencia de otros factores contenidos en SE-ILK. El marcado incremento de macrófagos en centros germinales de bazo y en la porción medular de los folículos de bolsa de Fabricio, fue un indicio probable de la presencia y procesamiento del VENC. La proliferación de células linfoides observada en bazo, bolsa de Fabricio y timo pudo ser inducida por este procesamiento.

En el grupo de pollos tratados con SE-ILK y no desafiados, se observó un efecto de corta duración en los cambios histológicos apreciados; estos cambios celulares fueron similares a los observados en el grupo SE-ILK_{VENC}. Sin embargo, la cantidad de células linfoides y macrófagos en bazo, bolsa de Fabricio y timo disminuyó rápidamente; al día 14 la cantidad de estas células en estos órganos no fue diferente a la apreciada en aves del grupo T(-). Sin estímulo antigénico es posible que la proliferación celular inicial inducida por SE-ILK regresara a los niveles poblacionales normales de un tejido no infectado.

Los interferones constituyen la primera línea de defensa ante infecciones virales. Se ha observado que la aplicación de anticuerpos contra IFN γ exacerba enormemente las infecciones virales (Gresser *et al*, 1976; Gresser, 1990). Varias veces se ha demostrado que las infecciones por virus causan enfermedades mucho más severas en animales tratados con anticuerpos contra IFN que en animales normales. Debido a esto no existe duda que el IFN constituye la primera línea de resistencia contra infecciones virales antes que los mecanismos del sistema inmune se movilicen completamente. Cuando la infección viral sobrepasa esta barrera natural, el virus se replica con el consecuente daño celular (Howard, 1993). Aunque se han considerado otros mecanismos en la protección y

profilaxis de enfermedades infecciosas, el uso de IFN γ es capaz de contrarrestar y eliminar infecciones persistentes de tipo viral (Joklik, 1990). Los resultados obtenidos por medio del aislamiento del virus así lo demuestran; ha sido significativa la diferencia existente entre los grupos SE-ILK_{VENC} y T(+) respecto al número de aislamientos del virus a partir de pollos infectados. Entre los días 3 y 7 el VENC fue aislado de órganos de sólo 3 pollos del grupo SE-ILK_{VENC}. Estos resultados adquieren mayor relevancia si se toman en consideración tres aspectos: a) la respuesta humoral contra el VENC tiene tanta importancia como en el caso de otros virus sistémicos; los pollos empleados en este estudio, por provenir de una parvada de reproductoras sin anticuerpos contra ENC, carecían de anticuerpos maternos o inmunidad pasiva; teóricamente, y como se observó en el grupo T(+), las aves se encontraban humoralmente desprotegidas ante la infección por VENC. b) El virus empleado en el desafío corresponde a una cepa velogénica virulenta capaz de producir el cuadro nervioso de la enfermedad, incluso un alto porcentaje de mortalidad considerando la ausencia de anticuerpos. c) La alta dosis de desafío inyectada intramuscularmente en los pollos ($10^{7.6}$ DIEP₅₀/ml).

La actividad hemoaglutinante del VENC y su inhibición específica con antisueros es el mejor indicio de su presencia en líquido alantoideo cosechado de embriones infectados (Alexander, 1989). La ausencia de mortalidad embrionaria y de hemoaglutinación de eritrocitos de pollo fue indicio de que el virus no se replicó en los órganos de pollos del grupo SE-ILK_{VENC}. Bajo las condiciones que ocurren naturalmente en el organismo, el IFN γ u otras linfocinas presentes en SE-ILK debieron proteger (por ellas mismas o por la inducción de otras) las células blanco de los efectos citopáticos del virus. Sin embargo, en este estudio no fue posible determinar el mecanismo de inhibición de la infección. Tampoco fue posible determinar la presencia y cantidad de otras linfocinas contenidas en SE-ILK, y que pudieron haber participado en la inhibición de la infección viral tanto *in vitro* como *in vivo*. Teniendo en consideración que la inhibición viral es efecto conocido del INF, y que éste fue detectado en SE-ILK, se podría considerar uno de los principales responsables del efecto antiviral observado. A pesar de ello y debido a la naturaleza redundante de las linfocinas, varias de ellas pudieron haber participado. Debido a que el IFN inhibe la replicación tanto de virus DNA como virus RNA, Joklik (1990) ha sugerido que una de las etapas del ciclo de replicación, común entre ambos grupos, es inhibida. Dicha etapa corresponde a la traducción del RNAm viral.

Una gran cantidad de trabajos se ha realizado para definir los mecanismos por los cuales los interferones inhiben la multiplicación de virus. El IFN induce el estado antiviral como resultado de la formación de ciertas proteínas, las cuales son las verdaderas efectoras de la inhibición viral (Joklik (1990). Los interferones inducen la activación de varias proteínas/enzimas. Dos sistemas enzimáticos inducidos por pequeñas cantidades de ssRNA y dsRNA han sido descritos; uno de ellos está representado por la enzima 2,5-oligo A sintetasa y el otro por una enzima de 67 kd denominada proteína quinasa (Hovanessian, 1981; Roberts *et al*, 1976). Estas enzimas están involucradas directamente con la inhibición selectiva de la replicación viral. Muchos sistemas de inhibición de la multiplicación viral inducida por IFN involucran interferencia en la traducción del RNAm viral; es decir, el IFN inhibe la traducción del RNAm viral. Como resultado, no se sintetizan las proteínas codificadas por el virus, los genomas de la progenie viral no se forman y la infección es abortada o inhibida (Joklik, 1990). Se ha demostrado que el tratamiento con IFN induce la activación de una enzima 2, 5-oligo A sintetasa que a su vez sintetiza el activador de una nucleasa latente (RNAasa L) que degrada el RNAm viral y por lo tanto inhibe la traducción y síntesis de proteínas virales (Chebath *et al*, 1987). Este patrón de inhibición funciona para muchas infecciones por virus, incluyendo reovirus, picornavirus, togavirus, rhabdovirus, herpesvirus, papovavirus, myxovirus y paramyxovirus (Chebath *et al*, 1987; Repik y col., 1974; Wiebe y Joklik, 1975; Yamamoto *et al*, 1975).

Un segundo mecanismo que explica la actividad antiviral del IFN involucra también la síntesis de una proteína y su subsecuente activación. Esta es la enzima proteína quinasa de 67 kd con efectos supresivos sobre la síntesis de proteínas. Normalmente se mantiene en un estado latente, pero es activada *in vivo* por infecciones virales (Hovanessian, 1981) o en cultivos celulares por pequeñas cantidades de dsRNA (Lebleu *et al*, 1976). Las circunstancias por las cuales induce el estado antiviral son similares a aquéllas para la 2,5-oligo A sintetasa (Gupta *et al*, 1982; Miyamoto y Samuel, 1980; Roberts, 1976; Samuel y Knutson, 1982).

Otros mecanismos involucrados en el establecimiento del estado antiviral han sido estudiados. Algunos estudios han encontrado que la transcripción del genoma de algunos virus (entre ellos el virus de la influenza) es inhibida en células tratadas con IFN (Brennan y Stark, 1983; Mitnacht *et al*, 1988; Oberman y Panet, 1988; Quesada *et al*, 1986; Ransohoff *et al*, 1985; Rubin y Gupta, 1980). Whitaker *et al* (1983) encontraron evidencia

de que los interferones pueden inducir cambios estructurales y de composición en membrana plasmática celular. En el caso del VEV, el IFN disminuye la cantidad de partículas virales liberadas de células tratadas; los virus liberados son deficientes en proteínas de membrana M y glucoproteínas G de las espículas (Jay *et al*, 1983), lo cual sugiere interferencia en el ensamblamiento de la progenie viral. En todos los casos, el tratamiento con IFN disminuye considerablemente el número y la actividad de las partículas virales liberadas (Aboud y Hassan, 1983).

Existen dos aspectos de particular interés con respecto a la actividad antiviral de IFN γ : a) en medicina humana, se ha mencionado que IFN γ es altamente efectivo *in vitro* pero clínicamente inefectivo (Merigan, 1987; Higgins *et al*, 1988; Schiller *et al*, 1988). b) En medicina veterinaria se ha reportado que IFN γ no es efectivo para inhibir algunos virus que infectan el tracto respiratorio en becerros y cerdos (Tizard, 1996). A diferencia de estas aseveraciones desfavorables en cuanto a su uso terapéutico sobre todo en medicina veterinaria, en este estudio hubo evidencia que la administración profiláctica de linfocinas contenidas en SE-ILK, entre ellas IFN γ , fue capaz de disminuir significativamente la infección y posterior aislamiento del VENC a partir de pollos desafiados con una cepa velogénica.

Existen varias estrategias para regular la respuesta inmune humoral contra VENC mediante el empleo de vacunas con virus activo o inactivado. La administración parenteral de una vacuna oleosa provoca una respuesta eminentemente humoral, en la que se generan niveles elevados de anticuerpos contra los componentes estructurales del virus; pollos que previamente han sido vacunados con virus activo muestran títulos de anticuerpos aún mayores. En términos generales, se considera que aves no vacunadas o sin exposición a virus de campo presentan títulos menores de 8 (1:8). Aves que han sido vacunadas y son resistentes al desafío tienen títulos entre 16 y 128. Títulos de 256 o mayores pueden indicar que una parvada ha sido inmunizada con varias vacunas de virus activo y al menos una vacuna inactivada emulsionada o que la parvada ha presentado recientemente un brote clínico.

Las vacunas no representan la única forma de manipular la rama humoral del sistema inmune. El IFN γ y otras citocinas tienen un impacto considerable sobre la respuesta inmune humoral (Durum y Oppenheim, 1993). Su uso es capaz de regular directamente la

proliferación, diferenciación y actividad de células plasmáticas biológicamente activas en la secreción de IgM, IgG e IgA (Trinchieri y Perussia, 1985; Morikawa *et al*, 1987; Sidman *et al*, 1984); se ha reportado que actúan como factor potencializador en la síntesis de anticuerpos durante infecciones virales (Sidman *et al*, 1984). En el sistema inmune murino, IFN γ aumenta selectivamente la expresión/producción de IgG_{2a} en suero (Snapper y Paul, 1987). El mecanismo por el cual induce la regulación de IgG_{2a} involucra un incremento en el número de células precursoras de esta inmunoglobulina y un aumento en el número de células hijas que derivan de cada célula precursora; asimismo, incrementa en gran medida la cantidad de moléculas IgG_{2a} secretada por célula (Snapper y Paul, 1987).

En la respuesta humoral de pollos tratados con SE-ILK y desafiados, el título promedio de anticuerpos aglutinantes obtenido al día 7 (588.84) fue significativamente mayor al de los grupos T(+) y SE-ILK-no desafiado. Los resultados sugieren que la seroconversión puede ser potencializada con el tratamiento de SE-ILK en pollos infectados con VENC, y que solamente el efecto conjunto de la infección viral y la actividad inmunomoduladora de SE-ILK es capaz de disparar los títulos de anticuerpos, ya que SE-ILK por sí solo no generó niveles significativos. El procesamiento del virus por células presentadoras de antígeno pudo haber influido en la proliferación de células linfoides, probablemente LB, observada en bolsa de Fabricio por histología, y del consecuente incremento de anticuerpos. El drástico decremento apreciado al día 14 (95.50) puso en evidencia la infección abortiva: el virus, según los resultados obtenidos por aislamiento viral, no infectó los tejidos de pollos tratados con SE-ILK; al mantenerse constantemente el virus en la circulación sanguínea, debió llevarse a cabo la unión virus-anticuerpo, resultando en la neutralización del virus y la rápida disminución de anticuerpos circulantes.

Cabe destacar que el tratamiento con SE-ILK fue capaz de potencializar rápidamente el título de anticuerpos en pollos infectados con VENC e incluso fue similar o mayor a aquéllos que puedan indicar que una parvada ha sido inmunizada con varias vacunas virus activo e inactivado (256 o mayores). Los resultados serológicos de las aves revelan que el VENC generó una síntesis elevada de anticuerpos en pollos del grupo T(+). Sin embargo, SE-ILK potencializó la respuesta primaria por anticuerpos en pollos tratados con SE-ILK y desafiados.

La inmunodepresión originada en parvadas de pollos comerciales suele ocasionar pérdidas económicas a la industria. Las parvadas inmunodeprimidas experimentan normalmente un pobre desarrollo corporal, como pudo apreciarse con la pobre GDP del grupo T(+). Una amplia variedad de agentes infecciosos, particularmente virus, puede ser causa de severa inmunodepresión y por consecuencia de bajo rendimiento corporal. En este estudio se examinó la posibilidad de usar linfocinas para evitar el impacto negativo de la infección por el VENC en la GDP de pollos de engorda.

Las citocinas tienen múltiples actividades sobre diferentes células blanco *in vitro* e *in vivo*. No sólo activan y amplifican las respuestas inmunes contra antígenos, sino que también median muchas respuestas fisiológicas durante situaciones de estrés (Lillehoj, 1991). Muchas citocinas regulan sistemas fisiológicos incluyendo crecimiento óseo, reparto de nutrientes y apetito (Klasing y Johnstone, 1991). Existen otras que participan en el rechazo al consumo de alimento y en el retraso del crecimiento observado en animales con un fin zootécnico. El TNF α ha demostrado claramente ser uno de los agentes más potentes y eficaces en la inducción de rechazo al consumo de alimento. Las citocinas desencadenadas por el estrés o por enfermedades infecciosas pueden ser la causa más significativa de pérdida de peso (Hargis, 1996). Concerniente al IFN γ , Tizard (1996) destacó que su uso a dosis elevadas es sumamente tóxico y causa inapetencia y pérdida de peso en animales domésticos.

En este estudio, el SE-ILK obtenido expresó niveles significativos de IFN γ . Su aplicación intraperitoneal en pollos evitó en forma significativa el impacto negativo sobre la GDP de la infección por VENC. No se observó diferencia significativa en la GDP del grupo SE-ILK_{VENC} en comparación con la del grupo T(-) durante el transcurso del estudio. Con estos resultados es posible inferir que en el SE-ILK utilizado no se encuentra presente algún factor o factores con efectos detrimentales en la GDP de pollos de engorda, y que el IFN γ contenido en SE-ILK y a la dosis administrada no es tóxico ni altera el peso corporal como se ha reportado en otras especies animales. Se puso en evidencia que la infección al nacimiento con VENC resulta en GDP reducida y que la aplicación de SE-ILK evita la pérdida de peso corporal.

El papel que desempeñaron las linfocinas en la resistencia al VENC incluyó regulación en la proliferación y reclutamiento de leucocitos (observada por un rápido acúmulo de

linfocitos y macrófagos en varios órganos); determinación y modulación del tipo de respuesta inmune que predomina después de un desafío (respuesta humoral en el caso del VENC) para ofrecer una mejor protección; regulación de la intensidad de la respuesta humoral (observada por incremento en títulos de anticuerpos de pollos tratados con linfocinas y desafiados); e inhibición de la infección (debido a que no fue posible aislar el virus a partir de tejidos de pollos tratados con SE-ILK). El equilibrio existente entre estas actividades regulatorias se reflejó básicamente en la ausencia del cuadro clínico de la enfermedad y efectos detrimentales del virus sobre la GDP.

En conclusión, la aplicación profiláctica de un SN de linfocinas obtenido a partir de aves inmunizadas con *S. enteritidis* fue capaz de disminuir de manera significativa la severidad de la infección producida por una cepa velogénica de VENC en pollos comerciales libres de anticuerpos. Un significativo efecto antiviral pudo ser inducido por SE-ILK tanto *in vitro* como *in vivo* ante una infección viral específica y común de aves comerciales. Sin descartar el efecto de otras linfocinas, dicho efecto pudo ser debido en parte al INF γ detectado en SE-ILK. Existe un extenso campo de estudio concerniente al papel que tienen varias citocinas en la inhibición de enfermedades aviares. Los avances tecnológicos en pruebas moleculares podrían facilitar su futura aplicación y uso en forma inmunoproláctica e inmunoterapéutica como se hace en otras especies animales y en el hombre. Los pasos iniciales que se han dado sugieren que las linfocinas, particularmente INF γ , podrían desempeñar un importante papel en el manejo clínico de infecciones virales en aves.

CAPÍTULO 6

LITERATURA CITADA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Celular and Molecular Immunology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Press, 1994.

About M, Hassan Y. Accumulation and breakdown of RNA-deficient intracellular virus particles in interferon-treated NIH 3T3 cells chronically producing Moloney murine leukemia virus. *J Virol* 1983;45:489-495.

Adair BM, McNeilly F, McConnell CD, Todd D, Nelson RT, McNulty MS. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimental infected chickens. *Avian Dis* 1991;35:783-792.

Agarwal SK, Cloud SS, Burnside J. Interferon activity of mitogen-induced chicken splenic lymphocytes which do not express interferon mRNA. *Vet Immunol and Immunopathol* 1996;53:269-275.

Alexander DJ. Newcastle Disease. In: Purchase HG, Lawrence H, Domermuth H, Pearson J, editors. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Pennsylvania:Kendall/Hunt Publishing Company, 1989:114-120.

Alexander DJ. Enfermedad de Newcastle y otras infecciones por paramyxovirus. In: Calnek BW, Barnes CW, Reid WM, Yoder HW, editores. Enfermedades de las aves. México:Manual Moderno, 1995:607-635.

Alexander DJ, Collins MS. The structural polypeptides of avian paramyxoviruses. *Arch Virol* 1981;67:309-323.

Allan WH, Lancaster JE, Toth B. Vacunas contra la enfermedad de Newcastle, su producción y empleo. 1a ed. Roma:FAO, 1980.

Bachmann M, Barner M, Viola A, Kopf M. Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection. *Europ J Immunol* 1999;29:291-299.

Beaman MH, Wong SY, Remington JS. Cytokines, toxoplasma and intracellular parasitism. *Immunol Rev* 1992;127:97-106.

Beard CW. Serologic procedures. In: Purchase HG, Lawrence H, Domermuth H, Pearson J, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.* Pennsylvania:Kendall/Hunt Publishing Company, 1989:192-200.

Belosevic M, Finbloom DS, van der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-INF gamma antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* 1989;143:266-274.

Billiau A. Interferon therapy: pharmacokinetic and pharmacological aspects. *Arch Virol* 1981;67:121-133.

Breed DG, Dorrestein J, Schetters TP, Waart LV, Rijke E, Vermeulen AN. Peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens produce gamma-interferon after stimulation *in vitro*. *Parasite Immunology* 1997;19:127-135.

Brennan MB, Stark GR. Interferon pretreatment inhibits simian virus 40 infections by blocking the onset of early transcription. *Cell* 1983;33:811-816.

Buscaglia C, Calnek BW. Maintenance of Marek's disease herpes virus latency *in vitro* by a factor found in conditioned medium. *J Gen Virol* 1988;69:2809-2818.

Byrnes S, Emerson K, Kogut M. Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony-stimulating factors and interferon. *Immunol Med Microbiol* 1993;6:45-52.

Castañón CJA. Comportamiento de un aislamiento velogénico del virus de la enfermedad de Newcastle en cultivos celulares (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1974.

Chambers P, Millar NS, Emmerson PT. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 1986;67:2685-2694.

Chebath J, Benech P, Revel M, Vigneron M. Constitutive expression of (2'-5') oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature* 1987;330:587-590.

Chen LL, Adams JC, Steinman RM. Anatomy of germinal centres in mouse spleen, with special reference to "follicular dendritic cell". *J Cel Biol* 1978;77:148-153.

Cheville NF, Stone H, Riley J, Ritchie AE. Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens. *J Am Vet Med Assoc* 1972;161:169-179.

Czarniecki CW, Fernnie CW, Powers DB, Estell DA. Synergistic antiviral and antiproliferative activities of *E. coli* derived human α , β and γ Interferons. *J Virol* 1984;49:490-496.

Czuprynski CJ, Brown JF, Young KM, Cooley AJ, Kurtz RS. Effects of murine recombinant interleukin-1 on the host response to bacterial infection. *J Immunol* 1988;140:962-968.

Dijkmans R, Decock N, Heremans H, Van Damme J, Billiau A. Interferon- γ is cytotoxic for normal mouse fibroblasts: enhancement by necrosis factor and interleukin-1. *Lymphokine Res* 1989;8:25-34.

Dijkmans R, Creemers J, Billiau A. Chicken macrophage activation by interferon: do birds lack the molecular homologue of mammalian interferon gamma? *Vet Immunol Immunopathol* 1990;26:319-332.

Douglas RM, Albrecht JK, Miles HB. Intranasal interferon- α 2 prophylaxis of natural respiratory virus infection. *J Infect Dis* 1985;151:731-736.

Dumonde DC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Morley J, Howson WT. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 224:38-42, 1969.

Durum S K, Oppenheim JJ. Proinflammatory cytokines and immunity. In: William EP, editor. *Fundamental immunology*. New York:Raven Press, 1993:801-835.

Entrican G, Haig M, Norval M. Identification of ovine interferons: differential activities derived from fibroblast and lymphoid cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;21:187-195.

Fenner F. The biology of animal viruses. Interference and interferon. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974.

Field AK, Tytell AA, Lampson GT, Nemes MM, Hilleman MR. Double-stranded polynucleotides as interferon inducers. *J Gen Physiol* 1970;57:90-95.

Fredericksen TL, Sharma JM. Purification of avian T cell growth factor and immune interferon using gel filtration high resolution chromatography. In: Weber WT, Ewert DL, editors. *Avian Immunology*. New York: Raven Press, 1987:145-156.

Friedman RM. Interferons. In: Oppenheim JJ, editor. *Textbook of immunophysiology*. New York:Oxford University Press, 1988:194-233.

García EG. Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.

Garten W, Berk W, Nagai Y, Rott R, Klenk HD. Mutational changes of the protease susceptibility of glycoprotein F of Newcastle disease virus: Effects on pathogenicity. *J Gen Virol* 1980;50:135-147.

Gerrard TL, Dyer DR, Zoon KC, Nedden DZ, Siegel JP. Modulation of class I and class II histocompatibility antigens on human T cell lines by INF- γ . *J Immunol* 1988;140:3450-3455.

Glickman RL, Syddall RJ, Ioro RM, Sheehan JP, Bratt MA. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol* 1988;62:354-356.

Grau GE, Heremans H, Piguests PF, Pointaire P, Lambert PH, Billiau A, Vassalli P. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5572-5583.

Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982;298:859-862.

Gresser I, Tovey MG, Maury C, Bandu MT. Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. II. Studies with herpes simplex, Moloney sarcoma, vesicular stomatitis, Newcastle disease, and influenza viruses. *J Exp Med* 1976;144:1316-1326.

Gresser I. Biologic effects of interferons. *J Invest Dermatol* 1990;95:66-74.

Grossberg SE. Interferon: an overview of their biological and biochemical properties. In: Pfeffer LM, editor. *Mechanism of Interferon Inducers Actions*. Vol. I. USA: CRC Press, 1987:91-103.

Gollapudi SS, Gupta HT, Pérez A. Use of lymphokines in treatment of experimental intracellular abdominal abscess caused by *Bacteroides fragilis*. *Infect Immunol* 1988;56:2269-2272.

Gómez VG. Identificación de linfocinas en sobrenadante de linfoblastos de pollo estimulados con concanavalina-A (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.

Gupta S, Holmes SL, Mehra LL. Interferon action against reovirus: activation of interferon-induced protein kinase in mouse L929 cells upon reovirus infection. *Virology* 1982;120:495-499.

Hargis BM. La influencia del estrés sobre la inmunidad de las aves y su resistencia a las enfermedades. Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar; 1996 marzo 15; México (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1996: 1-7.

Harvell EA, Spfitalny GL, Patel PS. Enhanced production of murine interferon gamma by T cells generated in response to bacterial infection. *J Exp Med* 1982;156:112-127.

Heremans H, Dijkmans R, Sobis H, Vandekerckhove F, Bilkan A. Regulation by interferons of the local inflammatory response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;138:4175-4183.

Hekman RA, Van Heuvel M, Tropman J, Zwarthoff EC. Expression of interferon in the testes of transgenic mice leads to infertility. *J Interferon Res* 1987;7:704-712.

Higgins PG, Al-Nakib W, William J, Tyrrell DAJ. Interferon- β as prophylaxis against experimental rhinovirus infection in volunteers. *J Interferon Res* 1986;6:153-159.

Higgins PG, Al-Nakib W, Barrow GI, Tyrrell DAJ. Recombinant human interferon-gamma as prophylaxis against rhinovirus colds in volunteers. *J Interferon Res* 1988;8:591-596.

Hirt HM, Becker H, Krichner H. Induction of interferon production in mouse spleen cell culture by *Corynebacterium parvum*. *Cell Immunol* 1978;38:168-175.

Hovanessian AG, Meurs E, Montagnier L. Lack of systematic correlation between the interferon-mediated antiviral state and the levels of 2-5 A synthetase and protein kinase in three different types of murine cells. *J Int Res* 1981;1:179-190.

Howard MC, Miyajima A, Coffman R. T-cell derived cytokines and their receptors. In: William EP, editor. *Fundamental immunology*. New York:Raven Press, 1993:763-800.

Huang RT, Rott R, Wahn K, Klenk HD, Kohama T. The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses. *Virology* 1980;107:313-319.

- Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A.** The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998;8:89-95.
- International Committee on Taxonomy of Viruses.** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. New York (USA):International Committee on Taxonomy of Viruses, 1995.
- Ito Y, Nagay Y, Maeno K.** Interferon production in mouse spleen cells and mouse fibroblasts (L cells) stimulated by various strains of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 1982;62:349-352.
- Jay FT, Dawood MR, Friedman RM.** Interferon induces the production of membrane protein-deficient and infectivity-defective vesicular stomatitis virions through interference in the virion assembly process. *J Gen Virol* 1983;64:707-712.
- Jokilä WK.** Interferons. In: Fields BN, editor. *Virology*. New York:Raven Press, 1990:383-410.
- Julius MH, Simpson E, Herzenberg A.** A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 1973;3:645-653.
- Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y.** Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect and Immun* 1989;57:609-615.
- Kaspers B, Lillehoj HS, Jenkins MC, Pharr GT.** Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;44:71-84.
- Klasing KC, Peng RK.** Influence of cell sources, stimulating agents, and incubation conditions on release of interleukin-1 from chicken macrophages. *Dev Comp Immunol* 1987;11:385-394.
- Klasing KC, Johnstone BJ.** Monokines in growth and development. *Poultry Science* 1991;70:1781-1789.

Klasing KC. Avian leukocytic cytokines. *Poultry Science* 1994;73:1035-1043.

Kogut MH, Slajchert T, Scott HM, Lange C. Protection of chicken from infection with *Eimeria tenella* following the *in vivo* administration of immune lymphokines. *Poultry Science* 1988;67:105 (suppl 1).

Kogut MH, Lange C. Recombinant interferon- γ inhibits cell invasion by *Eimeria tenella*. *J Interf Res* 1989;9:67-77 (a).

Kogut MH, Lange C. Interferon- γ mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. *J Parasitol* 1989; 75:313-317 (b).

Kogut MH, Slajchert T. T-lymphocytes confer protection in chicken against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immunol and Infect Dis* 1992;2:69-79.

3

Kogut MH, Moyers RB, DeLoach JR. Las citocinas y sus interrelaciones funcionales: potenciación de la respuesta inflamatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en las aves. Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar; 1996 marzo 15; México (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1996: 8-12 .

Kohase M, Moriya H, Sato T, Kohno S, Yamazaki S. Purification and characterization of chick interferon induced by viruses. *J Gen Virol* 1986;67:215-218.

Krempien U, Redmann I, Jungwirth C. Purification of chick interferon by zinc chelate affinity chromatography and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Interferon Res* 1985;5:209-216.

Kuby J. Immunology. 3rd ed. New York: WH Freedman and Company, 1997.

Lai M, Joklik WK. The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles. *Virology* 1973;51:191-204.

- Lam KM, Vasconcelos AC.** Newcastle disease virus-induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;44:45-56.
- Lamb RA, Kolakofsky D.** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe PM, Howley PM, editors. *Fundamental Virology*. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers, 1996:577-604.
- Lebleu D, Sen GC, Shaila S, Cabrer D, Lengyel P.** Interferon, double-stranded RNA and protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3107-3111.
- Leiby DA, Schreiber RD, Nacy CA.** INF- γ produced *in vivo* during the first two days is critical for resolution of murine *Leishmania major* infections. *Microbial Pathogenesis* 1993;14:495-500.
- Lillehoj HS.** Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to eimerian infections in inbred chickens. *Infect and Immun* 1989;57:1879-1884 (a).
- Lillehoj HS, Kang SY, Keller L, Sevoian M.** *Eimeria tenella* and *E. acervulina*: lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma or by sporozoite-stimulated immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. *Exp Parasitol* 1989;69:54-64 (b).
- Lillehoj HS.** Lymphocytes involved in cell-mediated immune responses and methods to assess cell-mediated immunity. *Poultry Science* 1991;70:1154-1164.
- Lucas AM, Jamroz C.** Atlas of avian hematology. Washington, DC, United States: United States Department of Agriculture (USDA), 1961.
- Luginbuke RC, Schlotzhaver SD.** SAS/STAT guide for personal computers. 6th ed. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, 1987:555-573.
- Luna LG.** Manual of histologic stainings methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

Martin A, Lillehoj HS, Kaspers B, Bacon LD. Mitogen-induced lymphocyte proliferation and interferon production following coccidia infection. *Avian Dis* 1994;38:262-268.

McGruder DE, Ray PM, Téllez IG, Kogut HM, Corrier DE, DeLoach JR, Hargis BM. *Salmonella enteritidis* (SE) leucocyte-stimulated soluble factors: effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day old Leghorn chicks. *Poultry Science* 1993;72:2264-2271.

McFerran JB, McCracken RM. Newcastle disease. In: Alexander DJ, editor. *Newcastle Disease*. Boston:Kluwer Academic Publ, 1988:161-183.

Merigan TC. Non-viral substances which induce interferons. In: Finter NB, editor. *Interferons and interferon inducers*. New York:American Elsevier, 1978:45-71.

Merigan TC. Is recombinant interleukin-2 the best way to deliver interferon-gamma in human disease? *J Interferon Res* 1987;7:635-639.

Mittnacht S, Straub P, Kirchner H, Jacobsen H. Interferon treatment inhibits onset of herpes simplex virus immediate-early transcription. *Virology* 1988;164:201-210.

Miyamoto NG, Samuel CE. Mechanism of interferon action: interferon-mediated inhibition of reovirus mRNA translation in the absence of detectable mRNA degradation but in the presence of protein phosphorylation. *Virology* 1980;107:461-475.

Monto AS, Shope TC, Schwartz SA, Albrecht JK. Intranasal interferon- α 2b for seasonal prophylaxis of respiratory infection. *J Infect Dis* 1986;154:128-133.

Morikawa K, Knbazawa H, Suzuki T, Cooper MD. Recombinant interferon α , β and γ enhance the proliferative response of human B cells. *J Immunol* 1987;139:761-766.

Naylor SL, Sakaguchi AY, Show TB, Law, ML. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J Exp Med* 1983;157:1020-1027.

Naylor SL, Gray PW, Lalley PA. Mouse immune interferon gene is on chromosome 10. *Somatic Cell Mol Genet* 1984;10:531-534.

Nacional Institute of Allergy and Infectious Diseases, World Health Organization. Interferon nomenclature. *Nature* 1980; 286:110.

Natt PM, Henrrick AC. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 1952;31:735-738.

Oberman F, Panet A. Inhibition of transcription of herpes simplex virus immediate early genes in interferon-treated human cells. *J Gen Virol* 1988;69:1167-1177.

Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *Int J Parasitol* 1995;25:1331-1351.

Parede L, Young PL. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. *Avian Dis* 1990;34:803-808.

Parry DA, Minasian E, Leach SJ. Conformational homologies among cytokines: interleukins and colony stimulating factors. *J Mol Recognit* 1988;1:107-127.

Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. *Cell* 1989;57:521-526

Paul WE. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1993.

Prowse SJ, Pallister J. Interferon release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. *Avian Pathol* 1989;16:439-442.

Pusztai R, Tarodi B, Beladi I. Production and characterization of interferon induced in chickens leucocytes by concanavalina-A. *Acta Virol* 1986;30:131-136.

Quesada JR, Talpaz M, Rios A, Kurzrock R, Gutterman JU. Clinical toxicity of interferons in cancer patients: a review. *J Clin Oncol* 1986;4:234-243.

- Quesada JR, Gutterman JU.** Interferons in the treatment of human neoplasms. *J Interferon Res* 1987;7:575-581.
- Raj KBK, Pitha PM.** Synthesis of new proteins associated with the induction of interferon in human fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4918-4922.
- Ransohoff RM, Maroney PA, Nayak DP, Chambers TM, Nilsen TW.** Effect of alpha-A interferon on influenza virus replication in MDBK cells. *J Virol* 1985;56:1049-1052.
- Ray PM, McGruder E, Kogut MH, Hargis BM.** The specificity of *Salmonella enteritidis* immunolymphokines and its protection against other *Salmonella* serovars in day-old Leghorn chicks. *J Immunol* 1993;150:315-320.
- Reem GH, Cook LA, Henriksen DM, Vilcek J.** Gamma Interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines. *Infect Immunol* 1982;37:216-221.
- Repik P, Flamand A, Bishop DH.** Effect of interferon upon the primary and secondary transcription of vesicular stomatitis and influenza viruses. *J Virol* 1974;14:1169-1178.
- Revel M.** Molecular mechanism involved in the antiviral effects of interferon. In: Gresser I, editor. *Interferon 1*. New York:Academic Press, 1979:101-163.
- Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM.** Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* 1976;264:477-480.
- Rott R.** Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. *Arch Virol* 1989;59:285-298.
- Rubin BY, Gupta SL.** Interferon-induced proteins in human fibroblasts and development of the antiviral state. *J Virol* 1980;34:446-454.
- Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S.** Convenient assay for interferons. *J Virol* 1981;37:755-758.

Russell PH. Monoclonal antibodies in research, diagnosis and epizootiology of Newcastle disease. In: Alexander DJ, editor. Newcastle Disease. Boston:Kluwer Academic Publ, 1988:131-146.

Samuel CE, Knutson GS. Mechanism of interferon action: kinetics of the induction of the antiviral state and protein phosphorylation in mouse fibroblasts treated with natural and cloned interferons. J Biol Chem 1982;257:11791-11795.

Schauenstein K, Globerson A, Wick G. Avian lymphokines 1. Thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells. Dev Comp Immunol 1982;6:533-540.

Schiller JH, Storer B, Bittner G, Willson JK, Borden EC. Phase II trial of a combination of interferon-beta and interferon gamma in patients with advanced malignant melanoma. J Interferon Res 1988;8:581-589.

Sekellick MJ, Marcus PI. Induction of high titer chicken interferon. Methods Enzymol 1986;119:115-125.

Sharma JM. Avances recientes en la inmunología aviar y la inmunomodulación. Memorias de la XIX Convención Nacional Anual ANECA; 1994 mayo 4-7; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1994:297-300.

Sharma JM, Karaca K, Erickson S, Winslow B, Junker DE, McMillen JK. Efecto del interferón recombinante sobre la inmunosupresión viral en pollos. Memorias de la XXI Convención Nacional Anual ANECA; 1996 mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1996:147-148.

Shat KA, Purchase HG. Cell-culture methods. In: Purchase HG, editor. Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Pennsylvania:Kendall/Hunt Publishing Company, 1989:167-175.

Sidman CL, Marshall JD, Shultz LD, Gray PW, Johnson HM. Gamma-interferon is one of several distinct B cell-maturing lymphokines. *Nature* 1984;309:801-804.

Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987;236:944-949.

Strander H, Boethrus J, Erhardt K. Does succesful interferon treatment of tumor patients require life-long treatment? *J Interferon Res* 1987;7:619-626.

Stryer L. *Bioquímica*. Vol II. 3a ed. Barcelona: Reverte SA, 1991.

Susuki Y, Orelfiba MA, Shreiber RD, Remington JS. Interferon- γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.

Télliez IG, Kogut H, Hargis BM. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks. *Avian Dis* 1993;37:1062-1070.

Terry WC. *Avian hematology and cytology*. 1a ed. Iowa: Iowa State University Press, 1988.

Tizard I. Uso de inmunomoduladores en medicina veterinaria, con especial énfasis en la inmunomodulación en las aves de corral. *Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar*; 1996 marzo 15; México (DF) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1996: 57-65.

Trinchieri G, Perussia B. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985;6:131-138.

Vilcek J. *Regulatory functions of interferons*. 2nd ed. New York:New York Academy of Sciences, 1979.

Vilcek J, Sen GC. Interferons and other citokines. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fundamental Virology*. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers, 1996:341-365.

Weiler H, von Bulow V. Detection of different macrophage-activating factor and interferon activities in supernatants of chicken lymphocyte cultures. *Avian Pathol* 1987;16:439-452 (a).

Weiler H, von Bulow V. Development of optimal conditions for lymphokine production by chicken lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;14:257-267 (b).

Wiebe ME, Joklik WK. The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon. *Virology* 1975;66:229-240.

Whitaker PA, Wilcox DK, Widnell CC, Youngner JS. Interferon-mediated inhibition of virus penetration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:1083-1086.

Wong GR. Inmunoprofilaxis mediante linfocinas aplicadas *in ovo* y en pollos de engorda contra la infección por *Salmonella gallinarum* (Tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.

Yamamoto K, Yamaguchi N, Oda K. Mechanism of interferon-induced inhibition of early simian virus 40 (SV 40) functions. *Virology* 1975;68:58-70.

Yip YK, Barrowclough BS, Urban C, Vilcek J. Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferon. *Science* 1982;215:411-413.

Zar J. Bioestadistical analysis. 2nd ed. New Jersey:Prentice-Hall Inc, 1984.

ANEXOS

- 1. Cultivos celulares de FEP.** Las células de 5 embriones fueron tratadas previamente con tripsina al 1%, disgregadas durante 20 minutos a 37 °C, filtradas con cinco capas de gasa estéril, centrifugadas (400 x g durante 10 minutos, a 4 °C) y suspendidas en medio esencial mínimo (MEM; GIBCO® Laboratories) con 5% de suero fetal bovino. La viabilidad e integridad celular fueron evaluadas mediante tinción con azul de tripan al 0.1%. La concentración final se ajustó a 1.5×10^5 células/ml. Se agregaron 100 μ l/pozo de la suspensión en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunc F96) y se dejaron incubar a 37.5 °C y 5% de CO₂, hasta que se observó el establecimiento del monoestrato celular, momento indicado para su utilización en el ensayo antiviral.
- 2. Titulación del inóculo viral de desafío.** Se realizaron diluciones décuples seriadas de la muestra de virus para su titulación. Se empleó PBS estéril como diluyente (pH 7.2) adicionada con antibióticos (P-E). La solución se pasó por autoclave para asegurar su esterilidad (15 libras/pulgada², 121.6 °C, 15 minutos). En tubos de ensaye con tapón de 10 ml de capacidad, se depositaron 4.5 ml de diluyente con una pipeta de 5 ml. Cada tubo fue marcado de 10^{-1} a 10^{-10} . Con una nueva pipeta de 1 ml, se depositó 0.5 ml de virus en el primer tubo y se homogeneizó; utilizando la misma pipeta se transfirió 0.5 ml de la dilución del virus (1:10) del primer tubo al segundo; una vez realizado lo anterior, la pipeta fue desechada. La segunda dilución (1:100) se mezcló utilizando otra pipeta de 1 ml. Esta sucesión de operaciones se repitió hasta el último tubo (marcado 10^{-10}). Se emplearon embriones de pollo LPE de 9 días de incubación para inocular las diluciones de virus. Con el fin de determinar la viabilidad de los embriones a inocular, se observaron con un ovoscopio 55 huevos embrionados. Los huevos viables fueron marcados con lápiz en el borde de la cámara de aire, al lado opuesto de la posición del embrión y en una zona libre de vasos sanguíneos. Se marcaron de 10^{-1} a 10^{-10} , grupos de 5 huevos. Se añadieron 5 huevos más al sistema de graduación como testigos; estos embriones fueron inoculados con PBS estéril. El cascarón de los huevos fue desinfectado en la zona de la marca hecha con lápiz; se empleó una mezcla de agua destilada, alcohol al 70% y tintura de yodo. Con un perforador eléctrico, se perforó levemente el cascarón de cada huevo, a 3 mm sobre el límite de la cámara de aire. Cada huevo se inoculó con 0.2 ml de dilución de virus, utilizando jeringas de insulina de 1 ml. La aguja se introdujo en posición vertical por la

perforación del cascarón, descargando el inóculo en la zona lateral del alantoides. La inoculación de los huevos se inició con la dilución 10^{-10} , empleando una jeringa por dilución; los huevos testigos fueron inoculados previamente con PBS estéril. Una vez inoculados, los huevos fueron obturados con pegamento líquido. Los embriones se regresaron a la incubadora, donde prosiguió la incubación a 37.7 °C. Diariamente, los huevos fueron observados con un ovoscopio durante tres días después de la inoculación. Los embriones muertos durante las primeras 24 horas se consideraron como muertes no específicas. Después de 24 horas de incubación, los huevos fueron examinados con ovoscopio 2 veces al día. La mortalidad observada se registró diariamente. Todos los embriones muertos fueron retirados y se comprobó la presencia de hemoaglutinina viral en el fluido alantoideo mediante la prueba de hemoaglutinación (HA) en placa. Se llevó a cabo un registro de la presencia de virus, de manera que los embriones infectados pudieran registrarse a medida que murieron. Los huevos restantes se dejaron incubar hasta el tercer día post-inoculación, al término del cual se marcaron y registraron los muertos. Tanto estos últimos como los vivos, fueron retirados de la incubadora y enfriados durante la noche a una temperatura de 4 °C. Después se examinaron para determinar si contenían hemoaglutinina viral mediante la prueba de HA en placa. Para ello, en una placa de hemoaglutinación se mezcló una pequeña porción de fluido alantoideo (0.2 ml) de cada huevo, con otra porción (0.2 ml) de una suspensión al 2.0% de glóbulos rojos de pollo. Se observó la HA (donde la hubo) después de 15 segundos y se verificó su especificidad inhibiéndola con antisuero específico de ENC. Los resultados de mortalidad embrionaria y de hemoaglutinación a partir del líquido alantoideo cosechado fueron registrados por dilución diariamente. Con los resultados obtenidos se utilizó la fórmula de Spearman-Kärber (Allan *et al*, 1980) para calcular el punto final de la dosis que infecta el 50 por ciento de los embriones, la cual fue de $10^{7.6}$ DIEP₅₀/ml.

- 3. Aislamiento del VENC.** Las muestras de órganos de cada ave (encéfalo, pulmón, tráquea y tonsilas cecales) fueron colectadas en cajas de Petri de vidrio estériles; se empleó una caja por ave. Las muestras fueron procesadas inmediatamente para su inoculación en embriones de pollo. En una campana de flujo laminar, las muestras se maceraron en morteros de porcelana. Las muestras de cada ave fueron maceradas juntas en un mortero con PBS estéril (pH 7.2); se empleó un mortero por ave. Una

suspensión de órganos al 20% fue preparada y centrifugada a 300 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue colectado del tubo de centrifuga con una jeringa de 10 ml y filtrado a través de membranas con poros de 0.45 µm. El filtrado resultante fue colectado en viales de 3 ml y adicionado con penicilina (1000 UI/ml) y estreptomycinina (1000 µg/ml). Se utilizaron embriones de pollo LPE de 9 días de incubación para inocular los filtrados de la suspensión viral. Con la finalidad de determinar la viabilidad de los embriones a inocular, previamente fueron examinados con ovoscopio. Los huevos viables fueron marcados con lápiz en el borde de la cámara de aire, al lado opuesto de la posición del embrión y en una zona libre de vasos sanguíneos. Se identificaron con la clave del ave y grupo correspondiente, grupos de 5 huevos. Se añadieron 5 huevos más como testigos; estos embriones fueron inoculados con PBS estéril. El cascarón de los huevos fue desinfectado en la zona de la marca hecha con lápiz; para ello se empleó una mezcla de agua destilada, alcohol al 70% y tintura de yodo. Con un perforador eléctrico se perforó levemente el cascarón de cada huevo, a una distancia de 3 mm sobre el límite de la cámara de aire. Cada grupo de embriones fue inoculado con el filtrado correspondiente. Cada huevo se inoculó con 0.2 ml de filtrado viral utilizando jeringas estériles de insulina de 1 ml (una por filtrado). La aguja se introdujo en posición vertical por la perforación del cascarón, descargando el inóculo en la zona lateral del alantoides dentro de la cavidad alantoidea. Una vez inoculados, los huevos se obturaron inmediatamente con pegamento líquido. Los embriones fueron regresados a la incubadora, donde prosiguió la incubación a 37.7 °C. Diariamente, los huevos fueron examinados con ovoscopio durante tres días después de la inoculación. Los embriones muertos durante las primeras 24 horas se consideraron como muertes no específicas. Después de 24 horas de incubación, los huevos fueron examinados con ovoscopio 2 veces al día. La mortalidad observada se registró diariamente. Todos los embriones muertos fueron retirados y se comprobó la presencia de hemoaglutinina viral en el fluido alantoideo mediante la prueba de HA en placa. Se llevó a cabo un registro de la presencia de virus, de manera que los embriones infectados pudieran registrarse a medida que murieron. Los huevos restantes se dejaron incubar hasta el tercer día post-inoculación, al término del cual se marcaron y registraron los muertos. Tanto estos últimos como los vivos fueron retirados de la incubadora y enfriados durante la noche a una temperatura de 4 °C. Después se examinaron para determinar si contenían hemoaglutinina viral mediante la prueba de HA en placa. Para ello, en una placa de

hemoaglutinación se mezcló 0.2 ml de fluido alantoideo de cada huevo con 0.2 ml de una suspensión al 2.0% de glóbulos rojos de pollo. Se observó la HA (donde la hubo) después de 15 segundos y se verificó su especificidad inhibiéndola con antisuero específico de la enfermedad de Newcastle. Los resultados de mortalidad embrionaria y de hemoaglutinación a partir del líquido alantoideo cosechado fueron registrados por ave y por grupo diariamente.

- 4. Técnica de inhibición de la hemoaglutinación (HI) procedimiento β .** Las muestras de sangre fueron colectadas individualmente en frascos de vidrio previamente identificados, de 10 ml de capacidad con tapón de goma. Una vez separados, los sueros fueron cosechados y colocados por grupos en microplacas (100 μ l/pozo). A partir de estos sueros se realizaron diluciones dobles seriadas. En otra microplaca con pozos de fondo en "u" y con una micropipeta de 12 canales, fueron depositados 50 μ l de PBS por pozo y se colocaron 8 muestras de suero en la primera columna de pozos. Después de ser mezclado el suero con un microdiluidor (dilución 1:2), 50 μ l de esta dilución se transfirieron a la siguiente columna resultando en una dilución 1:4. El mismo volumen fue transferido sucesivamente de columna en columna hasta la dilución 1:4096. Una vez realizadas las diluciones de suero, en cada uno de los pozos se agregaron 50 μ l de una preparación de antígeno, conteniendo 4 unidades hemoaglutinantes (HA) de VENC. Se dejó transcurrir 15 minutos para que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo. Después de este periodo de incubación, 50 μ l de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% fue depositada en cada uno de los pozos. Durante 30 minutos y a temperatura ambiente (20-22 °C) se dejaron sedimentar las placas, o hasta que se observó claramente la hemoaglutinación. El título de anticuerpos se expresó como el recíproco de la última dilución del suero que inhibió completamente la capacidad hemoaglutinante del virus. Con los datos obtenidos se realizó una transformación logarítmica y se obtuvo la media geométrica de los títulos de anticuerpos por grupo y por día de muestreo.

Cuadro 1. Comparación de los títulos de IFN en los distintos tratamientos

Grupos de tratamiento	Media en log ₂ ± desviación estándar ^a
Interferón de referencia ^b	16.00 ± (2.21) ^A
SE-ILK	14.67 ± (1.54) ^A
SN de aves no inmunizadas	5.33 ± (2.06) ^B
Testigo negativo	0 ± (0.00) ^C

^a Se realizó análisis de varianza con base en la raíz cuarta del log₂ del título de interferón.

^b Como referencia se utilizó un interferón purificado (1st lfn Ref Prep Inter Chick 67/18).

Valores con diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (Evaluado mediante la Prueba estadística de Duncan).

Cuadro 2. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de signos clínicos ^a

Grupo ^e	Respiratorios ^b	Digestivos ^b	Nerviosos ^{bc}	Otros ^{bd}	Mortalidad ^b
SE-ILK	0/40 (0%)	0/40 (0%)	0/40 (0%)*	0/40 (0%)*	0/40 (0%)*
SE-ILK _{VENC}	0/40 (0%)	0/40 (0%)	1/40 (2.5%)*	1/40 (2.5%)*	0/40 (0%)*
SNT _{VENC}	0/40 (0%)	0/40 (0%)	21/40 (52.5%)	40/40 (100%)	12/40 (30%)
T(+)	0/40 (0%)	0/40 (0%)	23/40 (57.5%)	40/40 (100%)	15/40 (37.5%)
T(-)	0/40 (0%)	0/40 (0%)	0/40 (0%)*	0/40 (0%)*	0/40 (0%)*

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron observados durante el transcurso de la fase experimental para determinar signos clínicos sugestivos de la enfermedad.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos un signo clínico dentro de cada una de las categorías sobre el total de aves evaluadas. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^c Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos uno de los siguientes signos nerviosos: convulsiones clónicas, temores, torticolis y/o movimientos opistótonos. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^d Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos uno de los siguientes signos: depresión, deshidratación, emaciación, postración y/o letargia. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

* Significativamente diferente del grupo testigo positivo ($p < 0.001$) evaluado mediante la prueba estadística de Ji-cuadrada.

^e SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 3. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante el grado de severidad de signos clínicos ^a

Grupo ^d	Convulsiones ^b	Torticolis ^b	Opistótonos ^b	Depresión ^b	Deshidratación ^b	Postración ^b	Promedio ^c
SE-ILK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SE-ILK _{VENC}	2.0	3.0	0.0	3.0	1.0	2.0	11.0
SNT _{VENC}	2.4	3.0	2.7	2.6	2.3	1.3	14.3
T(+)	2.6	3.0	2.8	2.7	1.9	1.5	14.5
T(-)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*Calificación: 0= ausente, 1= leve, 2= moderado, 3= severo

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron observados durante el transcurso de la fase experimental para determinar el grado de severidad de los signos clínicos sugestivos de la enfermedad.

^b Los valores están expresados como el promedio de la severidad del signo designado en las aves que lo presentaron en cada uno de los grupos.

^c Sumatoria de los promedios de la severidad de los signos por grupo.

^d SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 4. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de lesiones ^a

Lesiones	SE-ILK ^{bf}	SE-ILK _{VENC} ^{bf}	SNT _{VENC} ^{bf}	T(+) ^{bf}	T(-) ^{bf}
Respiratorias	0/40 (0%)	0/40 (0%)	0/28 (0%)	0/25 (0%)	0/40 (0%)
Digestivas ^c	0/40* (0%)	1/40* (0%)	12/28 (42.8%)	11/25 (44%)	0/40* (0%)
Encéfalo ^d	0/40* (0%)	1/40* (0%)	19/28 (67.8%)	22/25 (88%)	0/40* (0%)
Otras ^e	0/40* (0%)	1/40* (0%)	21/28 (75%)	21/25 (84%)	0/40* (0%)

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron evaluados a la necropsia durante el transcurso de la fase experimental para determinar lesiones aparentes sugestivas de ENC.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos una lesión dentro de cada una de las categoría sobre el total de aves evaluadas. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^c Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con hemorragias proventriculares. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^d Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos una de las siguientes lesiones en encéfalo: edema y/o congestión. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^e Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves con al menos una de las siguientes lesiones: esplenomegalia, congestión de bazo y/o bursitis. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

* Significativamente diferente del grupo testigo positivo ($p < 0.001$) evaluado mediante la prueba estadística de Ji-cuadrada.

^f SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 5. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante el grado de severidad de lesiones ^a

Grupo ^d	Edema ^b	Congestión ^b	Esplenomegalia ^b	Congestión de bazo ^b	Bursitis ^b	Hemorragias proventriculo ^b	Promedio ^c
SE-ILK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SE-ILK _{VENC}	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
SNT _{VENC}	1.4	1.1	2.6	1.9	1.6	1.1	9.7
T(+)	1.3	1.0	2.4	2.1	1.3	1.3	9.4
T(-)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*Calificación: 0= ausente, 1= leve, 2= moderada, 3= severa

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron evaluados a la necropsia durante el transcurso de la fase experimental para determinar el grado de severidad de las lesiones aparentes sugestivas de ENC.

^b Los valores están expresados como el promedio de la severidad de la lesión designada en las aves que la presentaron en cada uno de los grupos.

^c Sumatoria de los promedios de la severidad de las lesiones por grupo.

^d SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 6. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante observación de cambios histológicos ^a

Lesión ^c	SE-ILK ^{bd}	SE-ILK _{VENC} ^{bd}	SNT _{VENC} ^{bd}	T(+) ^{bd}	T(-) ^{bd}
<i>Encéfalo</i>					
ILPV	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)**	7/8 (87.5%)	7/8 (87.5%)	0/8 (0%)**
<i>Bazo</i>					
HN	0/8 (0%)**	0/8 (0%)**	8/8 (100%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)**
FCG	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)**	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	0/8 (0%)**
FNC	0/8 (0%)**	0/8 (0%)**	8/8 (100%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)**
<i>Timo</i>					
FNC	0/8 (0%)**	0/8 (0%)**	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	0/8 (0%)**
<i>Bursa</i>					
IM	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)*	5/8 (62.5%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)**
H y E	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)**	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)**
NFE	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)*	6/8 (75%)	5/8 (62.5%)	0/8 (0%)**
<i>Tonsilas</i>					
HCL	0/8 (0%)**	0/8 (0%)*	4/8 (50%)	5/8 (62.5%)	0/8 (0%)**
FCG	0/8 (0%)**	0/8 (0%)**	6/8 (75%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)**
<i>Proventrículo</i>					
FCG	0/8 (0%)**	1/8 (12.5%)*	7/8 (87.5%)	6/8 (75%)	0/8 (0%)**
CIICEG	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0/8 (0%)
<i>Tráquea</i>					
NDE	0/8 (0%)*	0/8 (0%)*	5/8 (62.5%)	4/8 (50%)	0/8 (0%)*
IHS	0/8 (0%)**	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)**
ILS	0/8 (0%)**	6/8 (75%)	6/8 (75%)	7/8 (87.5%)	0/8 (0%)**

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Muestras de órganos (encéfalo, bazo, timo, bursa, tonsilas, proventrículo y tráquea) fueron tomadas, fijadas y teñidas con H-E (2 pollos por grupo por muestreo).

^b Los valores de los tratamientos están expresados como número de órganos con la lesión indicada sobre el total de órganos evaluados. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

Significativamente diferente del grupo testigo positivo *($p < 0.005$), **($P < 0.001$) evaluado mediante la prueba estadística de Ji-cuadrada.

^c ILPV Infiltración linfocitaria perivascular
 HN Hiperplasia nodular
 FCG Formación de centros germinales
 FNC Focos de necrosis en corteza
 IM Infiltración de macrófagos
 H y E Hiperemia y edema
 NFE Necrosis folicular y epitelio
 HCL Hiperplasia de células linfoides
 CIICEG Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en epitelio glandular
 NDE Necrosis y desciliación epitelial
 IHS Infiltración heteroflica en submucosa
 ILS Infiltración linfocitaria en submucosa

^d SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 7. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante grado de severidad de los cambios histológicos observados ^a

Lesión ^d	SE-ILK ^{be}	SE-ILK _{VENC} ^{be}	SNT _{VENC} ^{be}	T(+) ^{be}	T(-) ^{be}
<i>Encéfalo</i>					
ILPV	0.0	2.0	2.7	2.6	0.0
<i>Bazo</i>					
HN	0.0	0.0	1.2	1.7	0.0
FCG	0.0	2.0	1.7	1.9	0.0
FNC	0.0	0.0	1.3	1.3	0.0
<i>Timo</i>					
FNC	0.0	0.0	1.8	1.8	0.0
<i>Bursa</i>					
IM	0.0	2.0	1.3	1.5	0.0
H y E	0.0	1.0	1.3	1.3	0.0
NFE	0.0	0.0	1.0	1.3	0.0
<i>Tonsilas</i>					
HCL	0.0	0.0	1.3	1.3	0.0
FCG	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0
<i>Proventrículo</i>					
FCG	0.0	1.0	1.3	1.5	0.0
CIICEG	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
<i>Tráquea</i>					
NDE	0.0	0.0	1.3	1.0	0.0
IHS	0.0	2.2	1.2	1.3	0.0
ILS	0.0	1.2	1.2	1.2	0.0
^c Promedio	0.0	11.4	19.6	21.7	0.0

*Calificación: 0= ausente, 1= leve, 2= moderada, 3= severa

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Muestras de órganos (encéfalo, bazo, timo, bursa, tonsilas, proventrículo y tráquea) fueron tomadas, fijadas y teñidas con H-E (2 pollos por grupo por muestreo).

^b Los valores están expresados como el promedio de la severidad de la lesión designada en las aves que la presentaron en cada uno de los grupos.

^c Sumatoria de los promedios de la severidad de las lesiones por grupo.

^d ILPV Infiltración linfocitaria perivascular
 HN Hiperplasia nodular
 FCG Formación de centros germinales
 FNC Focos de necrosis en corteza
 IM Infiltración de macrófagos
 H y E Hiperemia y edema
 NFE Necrosis folicular y epitelio
 HCL Hiperplasia de células linfoides
 CIICEG Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en epitelio glandular
 NDE Necrosis y desciliación epitelial
 IHS Infiltración heterofílica en submucosa
 ILS Infiltración linfocitaria en submucosa

^e SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 8. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 7 de edad ^a

Grupo ^c	Peso al día de edad (g)	Peso a los 7 días de edad (g)	GDP a los 7 días de edad (g) ^b
SE-ILK	41.52 ± 5.01 ^A	126.09 ± 21.42 ^A	14.09 ± 2.35 ^A
SE-ILK _{VENC}	39.23 ± 4.59 ^B	123.60 ± 19.12 ^{AB}	14.06 ± 3.20 ^A
SNT _{VENC}	39.71 ± 4.45 ^{AB}	104.65 ± 23.56 ^{BC}	10.82 ± 2.89 ^{BC}
T(+)	39.17 ± 4.78 ^B	96.05 ± 16.84 ^C	9.48 ± 2.29 ^C
T(-)	40.98 ± 5.23 ^A	126.18 ± 23.02 ^A	14.20 ± 1.98 ^A

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron pesados 7 días después del desafío.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como media ± desviación estándar. Valores con diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (evaluado mediante la prueba estadística de Duncan).

^c SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-IL.K, desafiado con VENC
SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 9. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 14 de edad ^a

Grupo ^c	Peso al día de edad (g)	Peso a los 14 días de edad (g)	GDP a los 14 días de edad (g) ^b
SE-ILK	41.52 ± 5.01 ^A	286.56 ± 45.42 ^B	18.85 ± 2.92 ^{AB}
SE-ILK _{VENC}	39.23 ± 4.59 ^B	293.74 ± 40.28 ^B	19.58 ± 3.01 ^A
SNT _{VENC}	39.71 ± 4.45 ^{AB}	238.29 ± 62.96 ^C	15.27 ± 3.33 ^C
T(+)	39.17 ± 4.78 ^B	241.65 ± 50.01 ^C	15.57 ± 3.54 ^C
T(-)	40.98 ± 5.23 ^A	305.54 ± 41.12 ^A	20.35 ± 2.83 ^A

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron pesados 14 días después del desafío.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como media ± desviación estándar. Valores con diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (evaluado mediante la prueba estadística de Duncan).

^c SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 10. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de la GDP en pollos al día 21 de edad ^a

Grupo ^c	Peso al día de edad (g)	Peso a los 21 días de edad (g)	GDP a los 21 días de edad (g) ^b
SE-ILK	41.52 ± 5.01 ^A	554.97 ± 89.03 ^{BC}	25.67 ± 4.16 ^A
SE-ILK _{VENC}	39.23 ± 4.59 ^B	570.41 ± 90.06 ^B	26.56 ± 4.33 ^A
SNT _{VENC}	39.71 ± 4.45 ^{AB}	438.60 ± 91.66 ^C	19.94 ± 5.51 ^B
T(+)	39.17 ± 4.78 ^B	458.38 ± 97.11 ^C	20.96 ± 3.38 ^B
T(-)	40.98 ± 5.23 ^A	596.02 ± 85.75 ^A	27.75 ± 4.22 ^A

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron pesados 21 días después del desafío.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como media ± desviación estándar. Valores con diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (evaluado mediante la prueba estadística de Duncan).

^c SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-IL.K, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 11. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante aislamiento del VENC de órganos de pollo infectados ^a

Grupo ^f	Día 3 ^{bd}	Día 7 ^{bd}	Día 14 ^{bd}	Día 21 ^{bd}	Total AV ^{bd}	Nº EPI ^{bce}
SE-ILK	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/40* (0%)	0/200** (0%)
SE-ILK _{VENC}	2/10* (20%)	1/10* (10%)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	3/40* (7.5%)	8/200** (4%)
SNT _{VENC}	9/10 (90%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	8/10 (80%)	37/40 (92.5%)	172/200 (86%)
T(+)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)	39/40 (97.5%)	191/200 (95.5%)
T(-)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/10* (0%)	0/40* (0%)	0/200** (0%)

^a Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Los pollos fueron sacrificados en cada día de muestreo y se colectaron muestras de encéfalo, tráquea, pulmón y tonsilas cecales para AV; las muestras se procesaron juntas.

^b Los valores de los tratamientos están expresados como número de aves infectadas con VENC sobre el total de aves evaluadas. Valor entre paréntesis muestra porcentaje.

^c La infección de los embriones de pollo fue determinada mediante la prueba de HA en placa y su inhibición mediante antisuero específico contra VENC.

^d Al menos uno de cinco embriones de pollo utilizados por ave para el AV estuvo infectado con VENC.

^e Por cada ave se utilizaron 5 EP. Por grupo tratado se emplearon 200 EP para aislar el VENC en el transcurso del estudio. Valores dados como Nº de EP infectados / total de EP por grupo utilizados en los 4 muestreos.

Significativamente diferente del grupo testigo positivo *($p < 0.005$), **($P < 0.001$) evaluado mediante la prueba estadística de Ji-cuadrada.

^f SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+) Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)
 T(-) Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)

Cuadro 12. Evaluación del efecto profiláctico de SE-ILK mediante análisis de títulos de anticuerpos^a en pollos infectados con VENC^b

Grupo ^d	Títulos de Ac 1 día edad ^c	Títulos de Ac 7 día edad ^c	Títulos de Ac 14 día edad ^c	Títulos de Ac 21 día edad ^c
SE-ILK	1.32 ± 0.22 ^a	47.86 ± 7.66 ^c	9.12 ± 1.48 ^d	3.0 ± 0.40 ^d
SE-ILK _{VENC}	1.15 ± 0.18 ^a	588.84 ± 90.14 ^a	95.50 ± 16.10 ^c	18.20 ± 3.03 ^c
SNT _{VENC}	1.15 ± 0.18 ^a	218.77 ± 36.46 ^b	446.68 ± 69.03 ^{ab}	165.96 ± 21.64 ^{ab}
T(+)	1.15 ± 0.18 ^a	218.77 ± 36.46 ^b	512.86 ± 79.46 ^a	190.54 ± 28.58 ^a
T(-)	1.15 ± 0.18 ^a	1.32 ± 0.22 ^d	1.15 ± 0.18 ^d	1.15 ± 0.18 ^d

^a Resultados de 5 sueros expresados como media geométrica

^b Los pollos fueron pesados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml de SE-ILK ó SNT al día de edad. Treinta minutos después las aves de los grupos correspondientes se desafiaron con VENC. Se obtuvieron muestras de suero a los días 1, 7, 14 y 21 de edad.

^c Los valores de los tratamientos están expresados como media ± desviación estándar. Valores con diferente literal son significativamente diferentes, $p < 0.05$ (evaluado mediante la prueba estadística de Duncan).

^d SE-ILK Grupo experimental tratado con SE-ILK, no desafiado con VENC
 SE-ILK_{VENC} Grupo experimental tratado con SE-ILK, desafiado con VENC
 SNT_{VENC} Grupo experimental tratado con SNT, desafiado con VENC
 T(+)
 T(-)

Grupo no tratado, desafiado con VENC (testigo positivo)

Grupo no tratado, no desafiado (testigo negativo)