

01690  
3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE LA  
RABIA COMO INMUNOMODULADOR EN VACUNAS DE  
INFLUENZA AVIAR, Y SU EVALUACIÓN  
INMUNOLÓGICA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A :  
**ELIZABETH LOZA RUBIO**

TUTOR:  
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
COMITÉ TUTORAL:  
JUAN ANTONIO MONTAÑO HIROSE  
LUIS PADILLA NORIEGA  
CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN  
ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003

1



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.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## DEDICATORIA

A Dios

El Señor es mi pastor; nada me faltará.  
En lugares de delicados pastos me hará descansar;  
Junto a aguas de reposo me pastoreará.  
Confortará mi alma;  
Me guiará por sendas de justicia por amor de  
su nombre

*Salmo 23:1-3*

Tú, Señor, me llenas de alegría con tus maravillas;  
Por eso alabaré jubiloso las obras de tus manos.

*Salmo 92:4*

A Víctor Manuel Sr  
Victor Manuel Jr  
César Efrén

Por su amor y apoyo incondicional

A mis padres  
Efrén y Carolina

A Elizabeth

A mis verdaderos amigos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

INIFAP

CONACyT (K0021)

UNAM (FMVZ; PAEP, 107303)

### *Por orden alfabético*

Fernando Esquivel Guadarrama  
Juan Molina Guarneros

Carlos y Cecilia De Mattos  
Miguel Ángel Gómez-Lim  
Pete Kaiser  
Nöel Tordo

### *Por orden alfabético*

Camila Arriaga Díaz  
Dióforo Batalla Campero  
Diego Braña Varela  
Octavio de Paz Villafán  
Daniel de la Rosa Mejía  
Fernando Díaz Otero  
Clara Espitia Pinzón  
Tamas Fehervari Bone  
Evelia Flores Mejía  
Francisco Flores Covarrubias  
Silvia García Álvarez  
Juan García García  
Lourdes Gutiérrez Xicotencatl  
Eliseo Hernández Baumgarten  
Bernardo Lozano  
Ramón Martínez Parra  
Juan Mercado Solís  
Juan Antonio Montaña Hirose  
Luis Padilla Noriega  
Carolina Ramírez Casillas  
Marco Antonio Rico Gaytán  
Eduardo Rivera Cruz  
Edith Rojas Anaya  
Jorge Torres Barranca  
María Roldán de Gordón  
Frida Salmerón Sosa  
Alejandro Suárez  
Francisco Suárez Güemes  
Antonio Verdugo Rodríguez

Y a todos aquellos que a lo largo de mi carrera profesional han colaborado a que logre cada una de las metas que me he propuesto, y que con un gesto, una palabra de ánimo, o incluso creando situaciones adversas han forjado mi carácter.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3

## ÍNDICE

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	ii
Índice de gráficas.....	iii
Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	81
PERSPECTIVAS.....	82
LITERATURA CITADA.....	83

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4

## INDICE DE FIGURAS

1. Representación esquemática de la presentación de un antígeno y de un superantígeno.....	5
2. Esquema de la estructura del receptor de linfocitos T.....	7
3. Replicación del virus de la rabia.....	15
4. Esquema de la estructura del virus de influenza.....	20
5. Purificación de la proteína N (NC) del virus de la rabia y visualización en geles de poliacrilamida.....	37
6. Identificación de la proteína N recombinante (N-Bac) en células Sf9.....	38
7. Purificación de la N-Bac y visualización en geles de poliacrilamida.....	39
8. Análisis de pureza de la proteína N del virus de la rabia, realizado por densitometría.....	41
9. Cuantificación de albúmina bovina.....	42
10. Detección mediante RT/PCR del ARNm de la $\beta$ actina de pollo.....	61
11. Expresión del ARNm de IL-2, a diferentes temperaturas de alineación.....	63
12. Detección de la $\beta$ actina y la IL-2 de pollo obtenidas de linfocitos de pollos, a los 10 días posvacunación.....	64
13. Mecanismo de ayuda intermolecular.....	74

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE TABLAS

<b>1. Comparación entre antígenos convencionales y superantígenos.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Taxonomía de los Lyssavirus utilizando criterio antigénico y molecular.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Secuencias de los iniciadores utilizados para establecer el ensayo de RT/PCR para detectar los genes de la <math>\beta</math> actina y la IL-2 de pollo.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Proliferación de linfocitos de pollos vacunados contra IA, usando vacuna Fz.....</b>	<b>46</b>
<b>5. Proliferación de linfocitos de pollo vacunados contra el virus de IA, usando NC del virus de la rabia.....</b>	<b>52</b>
<b>6. Proliferación de linfocitos de pollo vacunados contra el virus de IA, usando N-Bac.....</b>	<b>57</b>



## ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados con virus de IA adicionados con Fz.....	44
2. Porcentaje de protección conferida a pollos vacunados contra IA, adicionada con una vacuna tipo Fz.....	47
3. Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados con virus de IA, adicionados con NC.....	50
4. Porcentaje de protección conferida a pollos vacunados contra IA, adicionada con diferentes cantidades de NC.....	53
5. Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados con virus de IA,, adicionado con N-Bac.....	55
6. Comparación de la proliferación de linfocitos de animales vacunados con virus de IA, adicionado con dos diferentes fuentes de proteína N del virus de la rabia.....	58
7. Porcentaje de protección conferida por una vacuna de IA, adicionada con diferentes cantidades de N-Bac.....	61
8. Cinética de la síntesis del ARNm de la IL-2 de pollo.....	66

## ABREVIATURAS.

ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero.

CMV. Citomegalovirus.

CPH. Complejo principal de histocompatibilidad.

CTL. Células citotóxicas.

dNTP. Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DLEP. Dosis letal embrión de pollo.

DO. Densidades ópticas.

EBV. Virus de Epstein Barr.

e. e. m. Error estándar de la media.

Fz. Vacuna antirrábica tipo Fuenzalida.

GM-CSF. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor , factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.

IA. Influenza aviar.

IH. Inhibición de la hemaglutinación.

IL. Interleucina.

INF. Interferón.

LASI. Líquido alantoideo sin infectar.

MAM. *Mycoplasma arthritis* .

MDP. Muramil dipéptido.

**MGF.** Myelomonocytic growth factor. Factor del crecimiento mielomonocítico

**Mls.** Minor lymphocyte stimulatory antigens. Antígenos menores de estimulación de los linfocitos.

**MMTV.** Mouse mammary tumor virus. Virus del tumor mamario del ratón.

**MTT.** Sal de metil tetrazolio.

**N-Bac.** Proteína N recombinante del virus de la rabia, expresada en un sistema de baculovirus.

**NC.** Proteína N del virus de la rabia, obtenida de cultivos celulares infectados.

**ODN.** Oligodeoxinucléidos.

**PBS.** Solución salina fosfatada.

**pd.** Posdesafío.

**PePM5.** Péptido de la proteína M subtipo 5 del *Streptococcus equi*.

**pH.** Potencial de hidrogeniones.

**PM.** Peso molecular.

**pv.** Posvacunación.

**SAg.** Superantígeno.

**SC.** Subcutánea.

**SEA-SEE.** Enterotoxinas de la A a la E de *Staphylococcus aureus*.

**SEB.** Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*.

**SPE-A-C.** Enterotoxinas A a la C de *Streptococcus pyogenes*.

**TCR.** T cell receptor. Receptor de linfocitos T.

**TGF  $\beta$ .** Transforming growth factor. Factor transformante del crecimiento.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

iv A

**Th. Células cooperadoras.**

**TNF. Tumor necrosis factor. Factor de necrosis tumoral.**

**TSST-1. Enterotoxina del síndrome del choque tóxico.**

**V. A. Valor de absorbancia.**

**V $\beta$ . Región Variable de la cadena  $\beta$  del TCR.**

**VC. Vacuna comercial oleosa contra influenza aviar.**

**VIA. Vacuna de influenza aviar experimental.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

IVB

## RESUMEN

La proteína N del virus de la rabia ha sido propuesta como una nueva clase de inmunomodulador en ratones y en humanos. El objetivo de este estudio fue determinar si la proteína N del virus de la rabia era capaz de estimular la respuesta inmune humoral, celular y de protección, al ser adicionada en diferentes cantidades a una vacuna inactivada de influenza aviar (IA) evaluada en pollos. Como fuente de proteína N se usaron: vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (Fz), nucleocápside obtenida de cultivo celular infectado (NC) y proteína N obtenida por un sistema de expresión en baculovirus recombinante. (N-Bac). Por cada grupo, se inmunizaron pollos de ocho días de edad, vía subcutánea con vacuna contra IA (VIA) adicionada con Fz, y con VIA más diferentes cantidades de proteína N. Se tomaron muestra de suero a los días 0, 7, 14, 21 y 33 posvacunación. Los tratamientos que incluyeron la VIA adicionada con la Fz y la vacuna comercial contra IA (VC) más la Fz ( $p < 0.01$ ), así como los grupos que contenían 20  $\mu\text{g}$  de NC ó N-Bac, respectivamente resultaron los más eficientes ( $p < 0.01$ ). Los porcentajes de protección también se incrementaron, usando 20  $\mu\text{g}$  de proteína N. Se determinó, mediante RT/PCR que la proteína N es un mitógeno débil al no promover el incremento de interleucina-2 en linfocitos de pollos vacunados contra IA adicionada con la N-Bac. Este es el primer reporte de la utilidad potencial de la proteína N del virus de la rabia como un nuevo tipo de inmunomodulador en aves.

**Palabras clave.** Vacuna de influenza aviar inactivada, proteína N del virus de la rabia, interleucina 2 de pollos (IL-2).

## **ABSTRACT**

Rabies virus N protein has been proposed to work as a new class of immunomodulator. The purpose of this study was to determine if rabies N protein, when given to chickens together with an inactivated avian influenza virus (AIV) preparation could stimulate humoral, cellular and protective immunity. Three different sources of N protein were used: Fuenzalida vaccine (Fz), nucleocapsid (NC) obtained from infected cell culture, and a recombinant protein expressed in baculovirus (N-Bac). Groups of 8 day old chickens were vaccinated intracutaneously with an avian influenza experimental vaccine (AIV) supplemented with Fz and different quantities (0, 5, 10 and 20 µg) of one of these N proteins, respectively. Sera samples were taken at 0, 7, 14, 21 and 33 days post-vaccination. Treatments using AIV plus Fz and commercial vaccine (CV) plus Fz showed the better immune response ( $p < 0.01$ ), in the same way treatments containing AIV plus 20 µg of NC or N-Bac ( $p < 0.01$ ), respectively. Survival rates were also increased. A Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction (RT/PCR) assay to detect IL-2 mRNA in lymphocytes from chickens vaccinated showed rabies virus N protein is a weak mitogen, since treatment containing 20 µg of N-Bac do not produce high level of RNA expression in comparison with AIV and CV. This is the first report on the potential utility of the rabies virus N protein as a new kind of immunomodulator in poultry.

**Key words.** Avian inactivated influenza vaccine, N rabies protein, avian interleukin 2 (IL-2).

## **INTRODUCCIÓN.**

### **Inmunomoduladores.**

La palabra adyuvante proviene del latín "adjuvare" que significa ayudar. Estas sustancias se han utilizado para incrementar la respuesta inmune desde 1920. En 1925, Ramon demostró que era posible aumentar artificialmente la respuesta inmune contra la difteria y el tétanos, al agregarles sustancias como: agar, sales metálicas, lecitina o saponina (1).

Los adyuvantes juegan un papel importante en la eficacia de las vacunas. Muchas sustancias tienen propiedades adyuvantes y pueden ser clasificadas de diferentes maneras, una de ellas es como inmunomoduladores (2), estimulando anticuerpos específicos, linfocitos T cooperadores que producen citocinas y la inducción de células T citotóxicas, todo ello dando como resultado la protección ante un desafío (3). Sin embargo, los inmunomoduladores o los inmunoestimulantes tienen la propiedad no sólo de estimular sino también de suprimir el sistema inmune de una manera no específica. Se les ha llamado también "adyuvantes inmunológicos", en este rubro se encuentran generalmente moléculas pequeñas o proteínas las cuales incrementan o disminuyen las citocinas, producidas por la rama Th1 ó por la Th2 (2, 4, 5) .

Los inmunomoduladores son de origen natural, sintético e incluso recombinantes. (6). Algunas de las sustancias clasificadas como inmunomoduladores son: la Quil-A que es una fracción purificada de las saponinas, el muramil dipéptido (MDP), constituyente de la pared celular de micobacterias y los copolímeros combinados de cadenas de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos (2, 7, 8). Las vitaminas liposolubles también se consideran adyuvantes inmunológicos; en un estudio

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

donde se evaluó la eficiencia de estas sustancias al ser agregadas a una bacterina de leptospira, se demostró que las vitaminas A, D, E generaron la mayor respuesta de anticuerpos a los 90 días posvacunación (9). En cuanto al uso del levamisol, antiparasitario del grupo de los imidazoles, se ha reportado que su uso en bacterinas de *Brucella abortus* de la cepa 19 aumenta la respuesta inmune y la resistencia a la enfermedad (10).

Las citocinas también han sido utilizadas para modular la respuesta inmune. El interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ha demostrado su eficacia incrementando la eficacia de vacunas contra *Eimerias*, se menciona que incluso podría reemplazar a los adyuvantes convencionales oleosos que a menudo provocan reacciones adversas (11). El GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) es empleado en tratamientos experimentales contra cáncer (12). Asimismo esta molécula ha sido reportada como un modulador de la respuesta inmune cuando se adiciona a vacunas génicas contra el virus herpes simple, el herpes bovino 1 y el de la rabia en donde se vió un incremento en la protección, con aumento en la inmunoglobulina G y las células citotóxicas (CTL). No obstante cuando el GM-CSF se uso en vacunas de influenza humana, la protección no aumentó y hubo un decremento de CTL (13, 14, 15). Mediante el uso del GM-CSF es posible manipular la respuesta Th1/Th2, cuando se administra un plásmido recombinante que contiene el gen que codifica para esta citocina tres días antes de una vacunación génica, se induce una respuesta Th2, mientras que al inocularlo tres días después de la inmunización, la respuesta más patente es la Th1 (16). Existen

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



también reportes donde mencionan la acción inmune moduladora de otras interleucinas como la 2, 4, 5, 6, 10, 12 y 13 (17, 18).

Los oligodeoxinucleótidos (ODN) que contienen motivos CpG actúan como adyuvantes inmunes en ratón, promoviendo la respuesta humoral y celular cuando son co-administrados con algún antígeno. Recientemente se estableció el efecto inmunoestimulante de los ODN CpG adicionados a una vacuna de *Leshmania* evaluada en un modelo con primates, este modelo, permitirá valorar posteriormente su acción en humanos (19).

En general, sólo los adyuvantes inmunomodulatorios pueden ejercer su acción adyuvante cuando se inoculan previo al inmunógeno o en un sitio diferente de éste, como es el caso de la proteína N del virus de la rabia, pues al ser inoculada en ratones dos días antes de aplicar una vacuna inactivada contra influenza humana promovió la inmunidad humoral (20), lo mismo sucedió al inyectar la molécula dos días antes que una vacuna inactivada de parainfluenza 3 bovina (21).

Astoul et al (20) y Lafon M (22) reportaron que la proteína N del virus de la rabia promueve la inducción de células T y B después de una inoculación con virus no homólogos con rabia (influenza humana) y la proponen como un adyuvante que debe sus propiedades a su capacidad como superantígeno (SAg).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Superantígenos (SAG's).**

El término superantígeno (SAG) fue propuesto por White et al (23), para describir las propiedades de la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB). Si bien este concepto ha evolucionado desde entonces, aún se usa para designar a un conjunto muy variado de proteínas de origen parasitario, fúngico, bacteriano y viral, que tienen la propiedad de fijarse específicamente al receptor de los linfocitos T (TCR) y causar la proliferación de células T, pero de una manera diferente a la de los antígenos clásicos (22, 24, 25, 26).

Los superantígenos (SAG's) no requieren el procesamiento de antígeno por las células presentadoras (macrófagos, células B); sino que se unen por fuera del surco donde se encuentran los péptidos procesados, además son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II. Por otro lado, el haplotipo del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) no afecta la fijación del SAG, por lo que el reconocimiento de las células T no es CPH restringido. Asimismo, el reconocimiento de un SAG por el TCR (**Figura 1**) es conferida exclusivamente por la región variable ( $V\beta$ ) que al interactuar con éste induce una expansión clonal. Estas interacciones inducen una proliferación masiva de células T y una intensa producción de citocinas (27, 28, 29, 30, 31).

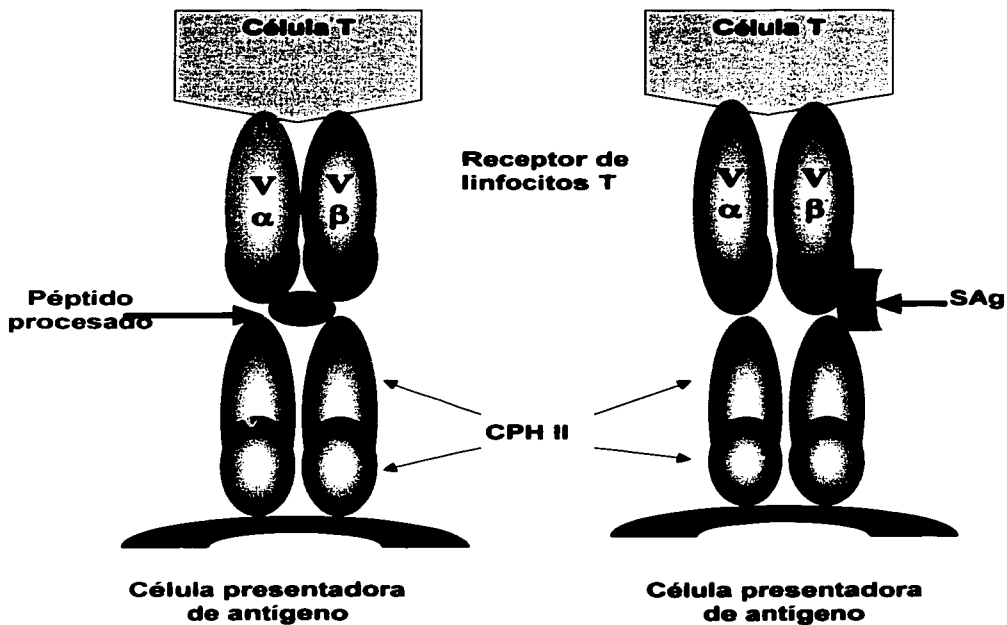


Figura 1. Representación esquemática de la presentación de un antígeno y de un superantígeno. Papageorgiou y Achaya (30).

Lo anterior puede resumirse en la **Tabla 1**.

	<b>Antígeno convencional</b>	<b>Superantígeno</b>
<b>Procesamiento</b>	Si	No ó limitado
<b>Presentación</b>	CPH I ó II	CPH I
<b>Elementos del TCR que intervienen</b>	V $\alpha$ , J $\alpha$ , V $\beta$ , D $\alpha$ , J $\alpha$ .	V $\alpha$
<b>Frecuencia de células que reaccionan</b>	0.01-0.0001%	1-40%

**Tabla 1.** Comparación entre antígenos convencionales y superantígenos (Maillard et al (32).

Mediante estudios de cristalografía con rayos X se ha observado que el sitio de unión del SAg, el péptido del CPH y el TCR se sobreponen, ya que el SAg actúa como una cuña entre la región V $\beta$  (segmento de genes, resultado de la maduración de los linfocitos T en el timo) del TCR y el CPH para desplazar el péptido antigénico lejos del sitio de la combinación del TCR (30, 31, 33) (**Figura 2**).

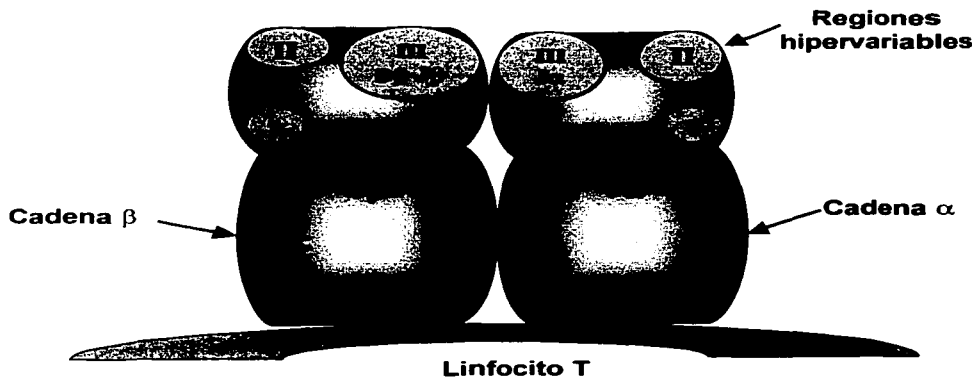


Figura 2. Esquema de la estructura del receptor de los linfocitos T (TCR). Astoul et al (20).

Según sus propiedades funcionales, se han descrito dos categorías de SAg's:

- a) Exógenos. En esta familia se encuentran SAG's de origen diverso, los más estudiados son los bacterianos, aunque también se encuentran algunos de origen viral y parasitario (24, 25, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40) .
- b) Endógenos. Corresponden al sistema denominado MIs (minor lymphocyte stimulatory antigens), que son secuencias provirales del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) integrado al genoma murino y que se transmite de manera vertical ( 41, 42, 43).

#### **Superantígenos bacterianos.**

Los superantígenos bacterianos son potentes estimuladores, caracterizados por la activación de una respuesta Th1 (44). Los más estudiados son los producidos por estafilococos, estreptococos y micoplasmas (40, 45). Los SAG's de este tipo poseen una actividad mitogénica *in vitro*, diferente a la de los mitógenos T (lectinas de plantas del tipo de la Concanavalina-A) los cuales no presentan especificidad para un elemento particular del TCR. El prototipo de los SAG's bacterianos son principalmente los de origen estafilocócico (enterotoxinas A, B y E, también conocidas como SEA, SEB y SEE). Estas toxinas fueron conocidas inicialmente por producir intoxicaciones alimentarias. Además, las toxinas del síndrome de choque tóxico (TSST) producen severos signos clínicos como fiebre alta y falla sistémica de órganos; otro SAg estafilocócico es el TSST-1 que se asocia con el TSS y está involucrado en el síndrome de Kawasaki, que produce serias complicaciones vasculares (40, 46, 47, 48, 49) Se ha reportado que los superantígenos estafilocócicos pueden estar involucrados con artritis y

desórdenes autoinmunes (26). Los SAg's estreptocócicos son las enterotoxinas A y C de *Streptococcus pyogenes* cuyas iniciales son SPE-A-C, que se piensa contribuyen a la patogénesis de la fiebre escarlatina (50), el péptido de la proteína M subtipo 5 del *Streptococcus equi* (PePM5) (51) El SAg expresado por el *Mycoplasma arthritis* (MAM) está involucrado en artritis crónica en roedores (44). Además, otras bacterias que expresan SAg's son: *Clostridium perfringens*, *Pseudomona aeruginosa*, *Yersinia* (*Y. enterocolitica* y *pseudotuberculosis*) y *Mycobacterium tuberculosis* (52, 53). Recientemente, se han realizado ensayos para proteger contra los efectos que producen las toxinas de SAg's bacterianos, para ello se han diseñado péptidos seleccionados por su capacidad de inhibir la expresión de interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF), citocinas responsables de producir los choques tóxicos. Estos péptidos se evaluaron en un modelo de ratón, en los cuales protegieron a los animales contra el desafío de la toxina letal de SEB y TSS-1 que comparten sólo un 6% en su secuencias (54).

El peso molecular de los SAg's bacterianos caracterizados hasta la fecha, varía de 22 a 66 kDa (32). Algunas propiedades de las enterotoxinas estafilocócicas A y E (SEA y SEE) son que poseen 90% de homología en su secuencia (55); sin embargo, cuando éstas son comparadas con SEB y SEC la homología puede ser de sólo 30% (45).

También se han encontrado SAg en parásitos como *Toxoplasma gondii* (24) y *Heligmoideis poligyry* (37); así como en hongos (*Candida albicans*) (25).

### **Superantígenos virales.**

Entre los SAg's virales más estudiados está el codificado por el virus del tumor mamario del ratón (MMTV). Este SAg viral se transmite de madres infectadas a su descendencia, a través de la leche durante las dos primeras semanas de vida: El sitio de entrada del virus al intestino son las placas de Peyer (56), de donde invade las células B, que son su blanco inicial, una vez que el genoma viral es transcrito se integra al genoma celular, el SAg es expresado en la superficie de las células B en asociación con el CPH clase II, lo cual produce que las células T sean estimuladas (32, 57). El repertorio del CPH clase II es crítico para el reconocimiento del SAg viral por las células T y afecta el resultado de la infección (43). El MMTV tiene una organización estructural mucho menos homogénea que los antígenos bacterianos, y se ha demostrado que codifica una glicoproteína transmembranal de 320 aminoácidos, cuya particularidad es que su extremo COOH (carboxilo) se encuentra al exterior de la célula, mientras que el extremo NH<sub>2</sub> (amino) se hunde en el citoplasma con sólo una región transmembranal (58). La docena de SAg's codificados por estos virus tienen secuencias muy parecidas que difieren principalmente en sus últimos 20 ó 30 aminoácidos carboxi-terminales. Las familias organizadas en función de sus homologías presentan en esta región grupos definidos superpuestos por el espectro de las cadenas variables  $\beta$  ( $V\beta$ ) del receptor de linfocitos T (TCR) ( $V\beta$ ) reconocidos (52, 59). Otros superantígenos virales que han sido identificados son los del herpesvirus saimiri que provoca linfomas T en simios y es capaz de inmortalizar linfocitos T humanos en cultivo (35), los del citomegalovirus (CMV), un herpesvirus que es ubicuo en la población en general, también es susceptible de poseer una molécula



superantigénica, pues se ha observado que en pacientes con SIDA, existe un incremento de linfocitos T  $V\beta 12$  cuando son positivos al CMV, situación que no ocurre cuando son negativos al mismo virus (60).

Continuando con la familia de virus herpes, se han observado propiedades superantigénicas en el virus de Epstein Barr (EBV) que es infeccioso para el hombre y puede originar linfomas T. Se ha demostrado que se induce una activación preferencial de linfocitos  $V\beta 13$  maduros o que provienen de la sangre del cordón umbilical en respuesta a linfocitos B infectados por el virus lítico. Por el contrario, una línea linfocitaria que no expresa proteínas provenientes del virus de EBV no induce la activación de linfocitos T  $V\beta 13$ , a menos que esta línea sea experimentalmente infectada; este fenómeno es dependiente pero no restringido a las moléculas del CPH (34).

Se ha propuesto la presencia de un SAg en la infección con el virus de la rubéola que es un paramixovirus ARN con polaridad negativa, no segmentado. Esta hipótesis fue apoyada por un estudio que puso en evidencia las modificaciones en el repertorio de linfocitos T en niños vacunados. Tales modificaciones se traducen en un aumento de linfocitos T  $V\beta 2$  y una disminución de los mismos después de la vacunación (61). Otras proteínas virales pueden poseer las propiedades de un SAg, como la proteína BEL-3 de los espumavirus, en conejo la proteína LAG de HTLV-1 (48) y el VIH en el que la proteína Nef es vital para su patogénesis, lo que puede deberse a sus propiedades de SA'g (62, 63).

### **Generalidades del virus de la rabia.**

Los virus de la familia Rhabdoviridae, que pertenecen al orden de los Mononegavirales, son los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que afectan a vertebrados, invertebrados y plantas. Los que infectan a los mamíferos se han clasificado en tres géneros: el de los Vesiculovirus, con el virus de la estomatitis vesicular como virus tipo, el de los Ephemerovirus con el virus de la fiebre efímera bovina como virus tipo y el tercer género representado por los Lyssavirus, con el virus de la rabia como virus tipo (64, 65, 66). Con base en sus relaciones serológicas (67) confirmadas con anticuerpos monoclonales, este último género fue dividido en cuatro serotipos (68, 69, 70, 71). Actualmente, por secuenciación del gene de la nucleoproteína (proteína N) se han caracterizado siete genotipos, los cuatro primeros corresponden a los mismos serotipos: genotipo 1, rabia; genotipo 2, Lagos Bat; genotipo 3, Mokola; genotipo 4, Duvenhage; genotipo 5, EBL 1 (Lyssavirus de murciélago europeo tipo 1), genotipo 6, EBL 2 (Lyssavirus de murciélago europeo tipo 2) y más recientemente el genotipo 7, ABL (Lyssavirus de murciélago australiano) (72, 73, 74) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Taxonomía de los *Lyssavirus* utilizando criterio antigénico y molecular Tordo et al (73).

<b>PROTOTIPO</b>	<b>SEROTIPO</b>	<b>GENOTIPO</b>	<b>DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA</b>	<b>ESPECIES ANIMALES</b>
<b>Rabia</b>	1	1	Mundial, excepto Nueva Zelanda, Antártica, Japón, Hawai, Inglaterra	Humanos, carnívoros, bovinos, murciélagos
<b>Lagos bat</b>	2	2	Nigeria, Guinea, Senegal, Etiopía, África Central y del Sur	Murciélagos insectívoros, gatos, perros y humanos
<b>Mokola</b>	3	3	Nigeria, Camerún, Etiopía, Zimbabwe, África Central	Humanos, musarañas, roedores, perro y gatos
<b>Duvenhage</b>	4	4	Sudáfrica, Zimbabwe	Humanos, Murciélagos insectívoros
<b>EBL1 Lyssavirus de murciélago insectívoro europeo tipo 1</b>		5	Europa	Humanos, murciélago insectívoro ( <i>Pipistrellus</i> ) (E.)
<b>EBL2 Lyssavirus de murciélago insectívoro europeo tipo 2</b>		6	Europa	Humano Murciélago insectívoro ( <i>Myotis</i> )
<b>ABL</b>		7	Australia	Humano, murciélago frugívoro ( <i>Pteropus</i> )

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

El virus de la rabia presenta forma de bala, con un diámetro de 75 nm y una longitud de 100 a 300 nm. Es de polaridad negativa, lo que significa que su genoma no puede ser traducido directamente a proteínas virales por los ribosomas, sino que debe haber una transcripción previa para producir ARNm. El genoma del virus de la rabia contiene 11932 pares de bases y codifica para una secuencia líder y 5 ARNm que codifican para un igual número de proteínas, las cuales pueden distribuirse en dos componentes principales: la nucleocápside (NC) y la envoltura. La NC es un complejo ribonucleoproteínico (RNP) con simetría helicoidal, constituida por una cadena de ARN asociada a la proteína N, la fosfoproteína (NS), y a la proteína L que constituye la transcriptasa. Las dos proteínas de la envoltura son la M que es una proteína matriz y la proteína G (glicoproteína), transmembranal, el único péptido viral externo que se une al receptor viral sobre la célula huésped (75, 76). Una particularidad del genoma del virus de la rabia es la existencia de una región que comprende 423 nucleótidos, que se encuentra entre las proteínas G y L, a la que se le ha denominado pseudogen  $\Psi$  (77, 78). Los ARN mensajeros presentan una cofia (CAP) y una cola de adeninas (79, 80) (Figura 3).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

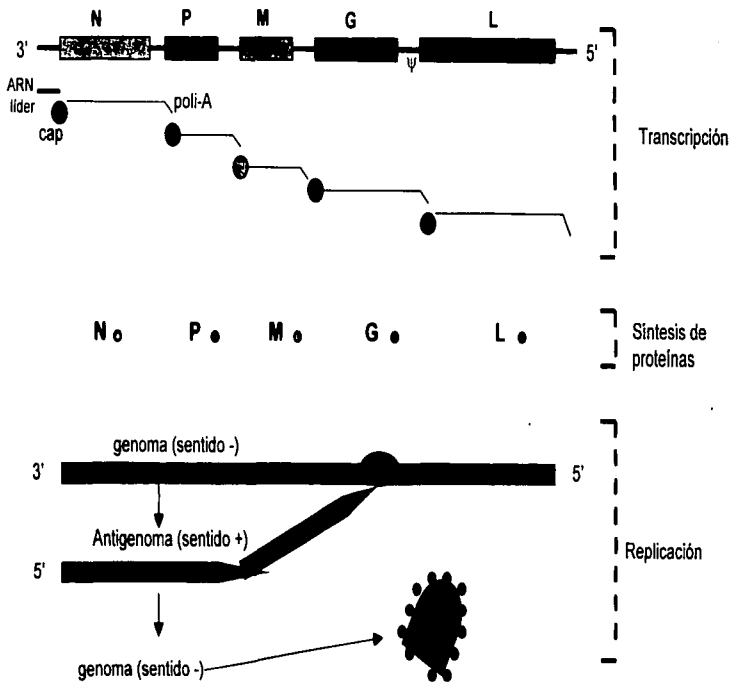


Figura. 3. Mecanismos de transcripción y replicación del virus de la rabia. Drings (150).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### **La proteína N del virus de la rabia.**

Esta proteína se compone de 450 aminoácidos, es fosforilada en el aminoácido 389 y tiene un peso molecular de entre 55 a 62 kDa (72, 79). Es la primera en ser sintetizada durante la replicación, representa 1258 copias en la nucleocápside purificada (80, 81, 82, 83). Su principal función es la de recubrir al genoma para protegerlo del ataque de las ribonucleasas (84, 85).

La proteína N tiene un papel importante en la respuesta inducida por la vacunación antirrábica. Montaña (86), evaluaron la concentración de proteína N en diferentes tipos de vacunas antirrábicas, observando que la vacuna tipo Fuenzalida (producida en cerebro de ratón lactante) contuvo una concentración de entre 5.6 a 5.8 mg/ml de proteína N libre, lo cual podría explicar la eficacia de las vacunas poco purificadas. Experiencias repetidas *in vivo* en varios modelos animales, mostraron que la presencia de la proteína N obtenida de los cultivos celulares infectados (NC), así como los de las proteínas N recombinantes aumentaban la protección inducida por la vacuna. En el primer caso se demostró que la NC fue capaz de inducir por sí misma inmunidad protectora en ratones, zorrillos y monos contra un desafío intramuscular (87, 88, 89, 90), e incluso se aduce que una simple inyección intraperitoneal con NC fue capaz de proteger a ratones no sólo contra el virus de la rabia sino también contra otros lyssavirus (91). La NC, se menciona también como el principal antígeno capaz de inducir células cooperadoras, que pueden conferir protección cruzada en monos contra los virus relacionados a rabia (92). En el hombre, los linfocitos de donadores vacunados estimulados *in vitro* con la proteína N produjeron anticuerpos contra el virus de la rabia (88, 93), que confirieron protección al desafío por vía intramuscular (86, 87, 88, 89). Drings (94) señalan que la proteína N expresada por un baculovirus recombinante aumenta la inmunogenicidad en ratones, cuando es adicionada a la proteína G obtenida en ese mismo sistema de expresión.

### **Proteína N: un superantígeno original.**

En años recientes se ha publicado que la proteína N del virus de la rabia posee propiedades superantigénicas en humanos y en ratones al inducir proliferación específica en las cadenas V $\beta$  8 y V $\beta$  6 del TCR, respectivamente. Además de unirse de una manera no restringida a las moléculas del CPH clase II e interactuar fuera del surco donde se unen los antígenos procesados de una manera clásica. La proteína N no está glicosilada ni presenta homologías a nivel de secuencias primarias con otros SAg descritos. Las tasas de similitud máxima se observan con el SAg de *Mycoplasma artheritidis* (MAM) con 52.5% y 21% de identidad (55, 95). La fijación de la proteína N a las moléculas de clase II del CPH ha sido demostrada comparando mediante citometría la unión de fibroblastos transfectados y sin transfectar con moléculas de HLA-DR. Esta fijación fue confirmada por análisis de la unión de la proteína N recombinante sobre linfocitos B que expresan diferencialmente varios isotipos de moléculas HLA; tal unión es disminuida por anticuerpos dirigidos contra las moléculas de clase II y, particularmente las específicas de la cadena  $\alpha$  de HLA-DQ,  $\alpha\beta$  de HLA-DR mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-cadena  $\beta$  no tiene efecto alguno. Este estudio ha permitido establecer que la proteína N se une a moléculas de clase II, sin presentar preferencia por ningún isotipo en particular, seguramente a nivel de la cadena  $\alpha$  (96).

La proteína N es pues un SAg en el humano que activa los linfocitos T V $\beta$  8+ (96). La inyección de 20  $\mu$ g proteína N en el cojinete plantar de ratones BALB/c seguida del análisis del repertorio de los linfocitos T en ganglios que están drenados, revelan un aumento de los blastos de linfocitos portadores de un elemento V $\beta$  6 o V $\beta$  7. Esto último aumenta en un factor de 2 para los V $\beta$  6, tres días después de la inyección. Después de diez días, las relaciones entre las

diferentes subpoblaciones de linfocitos decrece a su valor base, y no se pueden observar deleciones de los linfocitos T V $\beta$  6 maduros (99).

Si la proteína N se inyecta cada tercer día a ratones lactantes durante dos semanas, se observa después de cuatro a ocho semanas una reducción de linfocitos V $\beta$  6 en el timo y el bazo. Estos datos permiten establecer que esta proteína es un SAg también para el ratón (20, 99).

Lafon et al (99) demostraron que la proteína N es un SAg que posee la particularidad con respecto a otros de ser un mitógeno pobre *in vitro* en el ratón, ya que la sola adición de este SAg a linfocitos sin activar no es suficiente para provocar su proliferación. Esta propiedad podría estar relacionada con el hecho de que la Proteína N es un pobre inductor de IL-2, en comparación superantígenos bacterianos, los cuales inducen una fuerte producción de IL-2 (97). Otra particularidad es que no presenta ninguna identidad con las secuencias de otros SAg, por lo que representa una molécula aparte dentro de esta familia; asimismo activa un número limitado de V $\beta$  y también por sus propiedades exclusivamente estimuladoras sobre la respuesta específica inducida por la vacunación antirrábica.

En 1996, se notifica que este SAg puede ser un buen candidato como adyuvante debido a su capacidad de estimular la producción de anticuerpos específicos contra una vacuna preparada con un virus no homólogo al de la rabia, el virus de la influenza humana, ya que demostraron la presencia de anticuerpos y el establecimiento de memoria inmunológica en ratones (20, 95).

#### **Influenza aviar.**

El virus de la influenza aviar pertenece al igual que el de la influenza humana al tipo A de la familia *Orthomixoviridae*. El virus de la influenza aviar se encuentra

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



diseminado a nivel mundial y afecta una amplia variedad de aves. En general, las silvestres se consideran los reservorios de la enfermedad y es en estas aves donde ocurre la recombinación antigénica de los virus. En Gran Bretaña, se asevera existe un riesgo potencial de ingreso de cepas de alta patogenicidad a través de patos y gansos silvestres (100). Existen publicaciones que notifican a estas aves como los transmisores de la enfermedad a las aves domésticas (101, 102, 103, 104).

En las aves domésticas, produce manifestaciones clínicas dependiendo de la especie afectada, la edad, el subtipo y la virulencia del aislado. Los signos en las aves enfermas varían desde infecciones leves del tracto respiratorio, digestivo, reproductor y nervioso que causan baja en la producción de huevo hasta manifestaciones generalizadas previas a la muerte (105).

El genoma de los virus de influenza A consiste en ocho genes que codifican para diez proteínas: las polimerasas PB1, PB2, y PA, las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2 (Figura 4) (106).

La hemaglutinina (H) es una glicoproteína y representa el principal antígeno de la superficie del virus. Actualmente se conocen 15 subtipos de hemaglutininas antigénicamente diferentes H1-H15, de las cuales la H5 y la H7 han demostrado la capacidad de llegar a ser de alta virulencia, causando alta morbilidad y mortalidad (107, 108). En un análisis retrospectivo realizado en mercados de aves vivas en los Estados Unidos durante los años de 1993 al 2000, se encontraron virus H5 y H7, lo cual podría ser una alerta, ya que se sabe que subtipos de baja virulencia pueden mutar a subtipos de alta (109, 110).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

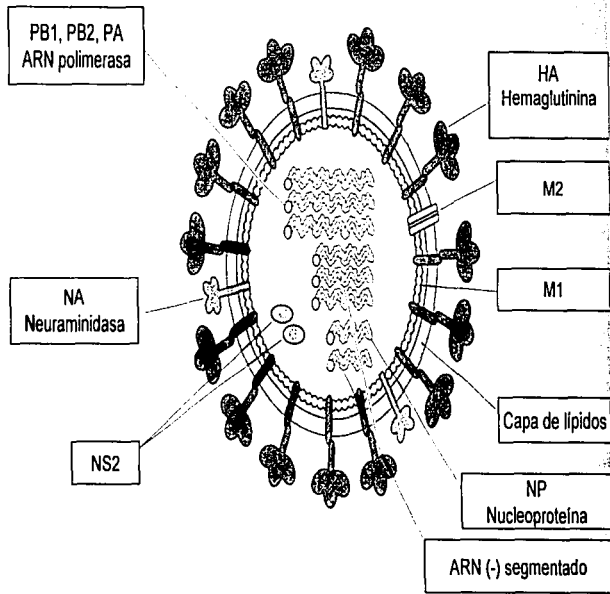
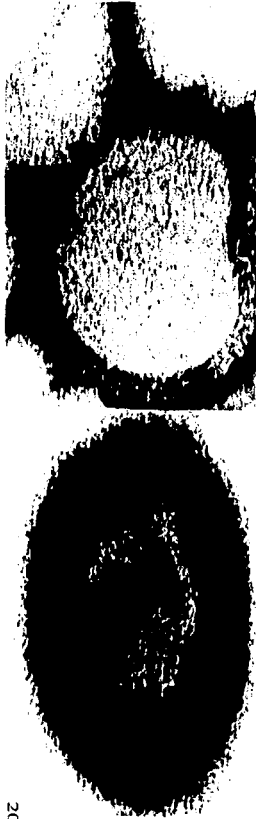


Figura 4. Esquema de la estructura del virus de la influenza. Lamb y Krug (106).

La neuraminidasa (N), es también una glicoproteína integrada a la envoltura del virus y el segundo antígeno principal de la superficie. Se conocen nueve subtipos de N (N1-N9) que carecen de reactividad serológica cruzada (106, 111).

En México, en Noviembre de 1993 se presentaron problemas respiratorios en pollos del centro del país, y aproximadamente un año después se confirmó la presencia serológica de un virus de la influenza de baja virulencia en once estados del país. En Noviembre de 1994, en el área de Tehuacán, Puebla enfermaron alrededor de un millón y medio de aves ponedoras por un virus que se comportaba diferente a los aislamientos anteriores. En Enero de 1995, en el Estado de Querétaro se caracterizó una cepa de alta virulencia, que obligó a tomar medidas preventivas, como restringir el movimiento de las aves y sus productos sin control oficial, monitoreo serológico y virológico, así como educación para la salud dirigida a veterinarios, granjeros y público en general (105, 112).

México fue el primer país en donde la vacunación fue el método de elección para el control de la influenza aviar, ya que posterior al aislamiento de una cepa de alta virulencia, las autoridades permitieron que algunos laboratorios manufacturaran una vacuna inactivada emulsionada en aceite, todo esto siguiendo un protocolo oficial. Esta vacuna únicamente puede ser empleada previo permiso oficial, el cual se otorga cuando las autoridades sanitarias consideran que la explotación solicitante se encuentra en una zona de riesgo (112). Otra de las vacunas que han sido aplicadas en el país es una vacuna recombinante de viruela aviar que contiene el gen H5 del virus de IA. Este inmunógeno es capaz de proteger pollos contra cepas mexicanas H5N2 de baja y alta virulencia, con la ventaja de que la diseminación del virus de IA a través de heces de pollos desafiados con un virus de baja

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

virulencia se ve reducida, además los animales desafiados con una cepa de alta virulencia se protegen y previene la diseminación del virus si se mezclan individuos vacunados y no vacunados (113). Además de México, otro país que hizo frente a un brote de influenza producido por un virus de alta virulencia (H7N3) fue Pakistán en 1996 (114).

En 1997, el virus de IA de alta virulencia H5N1 fue aislado en Hong Kong, a partir de un 20% de pollos aparentemente sanos que eran vendidos en los mercados. El virus H9N2 fue el segundo más prevalente durante ese brote, ya que se aisló de un 5% de los pollos muestreados (115). En este brote, la principal medida de control fue el sacrificio de las aves, así como medidas cuarentenarias.

Estudios realizados a nivel experimental para evaluar una vacuna recombinante comercial y una inactivada experimental, con las cepas de desafío A/HK/156/97 de IA y la A/HK/483/97 aislada de un caso fatal de humano, muestran que la protección conferida (>80%) no fue consistente, atribuyendo este hecho a las diferencias antigénicas que existen en la hemaglutinina de las vacunas evaluadas y las cepas de desafío (117).

En Italia, de Marzo a Diciembre de 1999 se presentaron 199 brotes causados por un virus de influenza de baja virulencia H7N1, posteriormente en el mes de Diciembre se identifica un virus de alta virulencia H7N1, que afectó alrededor de 13 millones de aves, lo cual causó severas pérdidas económicas a la industria avícola italiana (108). Si bien, en ese momento la vacunación no fue permitida debido a que puede enmascarar infecciones de campo, no se descarta la posibilidad de que se utilice en futuros brotes (118).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La vacunación contra influenza aviar esta prohibida en los Estados Unidos y en Europa, por considerar a esta enfermedad como de presentación regional y tener el inconveniente de no permitir una vigilancia epidemiológica adecuada, pues al realizar monitoreos serológicos no se sabría si los anticuerpos detectados son vacunales o por infección (118), no obstante en algunos casos la vacunación se ha utilizado para programas de control durante ciertos brotes en pavos, es así como entre 1979 a 1997, se han empleado 22 millones de dosis sólo en el estado de Minnesota (119).

A nivel experimental, han sido evaluadas diferentes tipos de vacunas. Las emulsionadas en aceite, que confieren un rango de protección mayor al 80% (120, 121). Las vacunas producidas con la tecnología del ADN recombinante, la mayoría de las cuales contienen al gen de la hemaglutinina del virus de influenza aviar, una de ellas clonada en un vector de virus vaccinia de pollo (Canarypox), demostró conferir protección ante el desafío con virus de alta virulencia de influenza aviar; sin embargo cuando los pollos fueron pre-inmunizados con una vacuna de viruela aviar, esta vacuna recombinante no confirió la protección adecuada contra este poxvirus (122). Al expresar los subtipos H5 y H7 en un sistema recombinante de Baculovirus, se observó que 0.2 µg de las proteínas expresadas fueron capaces de proteger 100% ante un desafío, aunque los anticuerpos producidos no sobrepasaron un título de 256 (123). La hemaglutinina ha sido expresada en plásmidos (vacunación génica) y se reporta que un µg de ADN proporcionado en dos ó más ocasiones protege 100%; al inyectar una sola dosis de 10 a 100 µg confiere esta misma protección; aunque al realizar el desafío no se detectó un

incrementó en el nivel de anticuerpos, sugiriendo una inhibición de la replicación del virus después del reto (124).

### **JUSTIFICACION.**

Por las características de la proteína N del virus de la rabia como superantígeno: como la de ser un mitógeno débil, potenciador de la formación de anticuerpos contra la rabia y de algunos elementos del sistema inmune contra virus no homólogos como el virus de la influenza humana (19, 94) permitía pensar en esta molécula como un adyuvante eficaz para el virus de la influenza aviar, él cual a partir de 1994 ha presentado interés en la producción pecuaria (125, 126). Sin embargo, con excepción del modelo del ratón no se conoce qué tipo de respuesta inmune se produce al aplicar la nucleocápside (constituída en un 90% por la proteína N) como potenciador de la misma. Por otro lado, es de interés evaluar la respuesta de diferentes fuentes de la proteína N, como lo sería la contenida en una vacuna tipo Fuenzalida y la obtenida mediante un sistema recombinante como el del baculovirus (127), ya que con los métodos reportados se obtiene poca cantidad y no es económico (92).

La obtención de un buen adyuvante para vacunas que se emplean contra la influenza aviar aumentaría la eficacia de estos productos. Dichos estudios son de importancia en la industria de producción de biológicos veterinarios, ya que un buen adyuvante es bien cotizado.

En el presente trabajo se evaluó a la proteína N al ser utilizada como potenciador de la respuesta inmune.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **HIPÓTESIS**

La proteína N del virus de la rabia aumentará la respuesta inmune humoral, celular y protectora en aves inoculadas con el virus de la IA.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la proteína N del virus de la rabia estimula la respuesta inmune humoral, celular y la protectora al ser empleada en vacunas contra el virus de influenza aviar en aves.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar si la vacuna tipo Fuenzalida (Fz) que contiene mayores cantidades de proteína N que las producidas en cultivo celular, es capaz de potenciar la respuesta inmune humoral contra el virus de influenza en aves.
- Obtener nucleocápside a partir de cultivos celulares infectados para ser evaluada como adyuvante en las vacunas contra el virus de influenza en aves.
- Purificar la proteína N obtenida a partir del sistema recombinante del Baculovirus.
- Comparar la eficiencia de la NC obtenida a partir de cultivos celulares infectados y la proteína recombinante, como inmunomodulador en vacunas de influenza aviar en aves, evaluando la respuesta inmune humoral y celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Cultivos celulares.**

*Células BHK-21* (*In vitro*, D. F., México).- Se utilizaron para la producción de la NC, esta línea celular fue obtenida originalmente de cultivos de riñones de hámsters recién nacidos. Las células fueron cultivadas a 37° C en monocapa, para su crecimiento se empleó el medio mínimo de Eagle (MEM) (*In vitro*, D. F., México), suplementado con 10% de suero fetal bovino (*In vitro*, D. F., México).

Sf9, *Spodoptora frugiperda* (Gibco, BRL, N.Y., USA).- Esta línea se usó para la expresión de la proteína N recombinante, se cultivaron en monocapa a 28° C, para su crecimiento se utilizó el medio SF II (Gibco, BRL, N. Y., USA).

### **Virus.**

*Rabia*.- La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (Fz) ya no se utiliza en México, este biológico era producido con 3 cepas de virus rábico: 51, 91 y CVS; sin embargo para la elaboración de la vacuna tipo Fz se utilizó la metodología reportada por Díaz (128). En este estudio sólo se utilizó el virus estándar (CVS) que se emplea para realizar pruebas de titulación de anticuerpos y para desafiar en ensayos de protección. Inicialmente, el CVS fue obtenido del Centro de Control y Prevención de las Enfermedades (CDC, Atlanta, Georgia EUA).

*Influenza aviar*.- La vacuna experimental contra la influenza aviar se preparó inoculando huevos embrionados de 9 días, con la cepa A/Ck/CPA-238/94(H5N2) de baja virulencia (donada por Laboratorios AVIMEX, México), según el protocolo de Barret e Inglis (129). El mismo virus se empleó para la activación de linfocitos en el ensayo de proliferación. Para el desafío se utilizó la cepa de alta virulencia (H5N2) A/Ck/Qro/14588-19/95 (donado por el Dr. Juan García G, INIFAP, México).



### **Producción y purificación de la nucleocápside (NC) del virus de la rabia.**

La nucleocápside del virus de la rabia, se obtuvo a partir de cultivos infectados de células BHK-21, con virus PV (Pasteur virus) ( $10^4$  DL50), utilizando dos diferentes métodos: 1) Método de Perrin (130), en el cual los monoestratos infectados se incubaron a  $37^\circ$  C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se desechó el sobrenadante, y se lavaron los monoestratos con solución NT (Tris-Cloruro de sodio, pH 7.6. Las células se separaron del plástico, utilizando perlas de vidrio estériles y solución NT. Los monoestratos obtenidos de todas las botellas se colocaron en un tubo, que se centrifugó a  $500\times g$  durante 15 min a  $4^\circ$  C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó dos veces con NT. Posteriormente, se agregó agua destilada que se dejó en contacto durante 60 min, se maceró en un mortero de Dounce, para luego centrifugarlo a  $4,500\times g$  durante 10 min., a  $4^\circ$  C. 2) Método de Sokol (131), cuyas principales diferencias con el método anterior es que la solución para enjuagar los monoestratos es PBS, pH 7.4. A continuación de centrifugar el sedimento se lavó dos veces con PBS, se agregó agua destilada que se dejó durante diez min. para proceder después a macerar en un mortero de Dounce, y centrifugar a  $4500\times g$  durante diez min, a  $4^\circ$  C.

Para la purificación se emplearon gradientes de cloruro de cesio (CsCl), para ello se adicionaron 2 g de CsCl a 4.5 ml del sobrenadante obtenido, mezclando suavemente. Se centrifugó durante 24 h a  $150,000$  g, en un rotor Beckman SW50, al finalizar la centrifugación se obtuvo la banda que correspondió a la nucleocápside, y se dializó (Gibco BRL, NY, USA) contra amortiguador NT.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Producción y purificación de la proteína N recombinante (N-Bac)**

El baculovirus recombinante fue una donación de los Dres. Tordo y Jacob del Instituto Pasteur en Paris, Francia. Para la producción de la proteína N recombinante se utilizaron células de insecto Sf-9 (Gibco, BRL, N.Y., USA) crecidas en medio Sf-900 II SFM (Gibco, BRL, NY., USA) en monoestrato infectadas a un índice de multiplicidad (MOI) de 1. Después de la infección, las células se cosecharon a las 48 h, y se procesaron en la misma forma que la NC obtenida de cultivos celulares infectados (130). El procedimiento para la purificación fue el mismo que para la NC.

### **Cuantificación y análisis electroforético de la NC y la N-Bac.**

Las proteínas dializadas se cuantificaron mediante el método de Lowry (132), posteriormente se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida (12.5%) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), bajo condiciones reductoras, de acuerdo al método descrito por Laemmli (133). La separación electroforética se efectuó a 120 V. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.5% y se destiñeron con una mezcla de ácido acético al 10% (134). Asimismo, se realizó una curva de albúmina bovina para utilizarla como estándar de la cantidad de proteína, tanto los geles de las proteínas problema, como el de la curva de albúmina se analizaron en un densitómetro CDS-200 (Beckman, Brea, Ca, USA).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Animales.**

Para la preparación de la vacuna tipo Fz, se emplearon ratones albinos cepa CD-21 de entre 1 a 3 días de edad. Los animales fueron mantenidos en instalaciones adecuadas y se les proporcionó leche materna *ad libitum*.

Para evaluar la inmunidad humoral, celular y protectora, se adquirieron huevos embrionados, en la compañía Aves Libres de Patógenos Específicos (ALPES) (Puebla, México) que se incubaron hasta el nacimiento. Las aves fueron nutridas con alimento comercial y agua *ad libitum*, se alojaron en jaulas convencionales con calefacción local, en unidades de aislamiento que contaban con sistema de filtración con presión negativa, filtros absolutos y una cortina de luz ultravioleta a la salida del aire, ubicadas en el Centro Nacional de Microbiología Veterinaria-INIFAP en México D. F. Las edades de los animales se detallan en cada uno de los ensayos realizados.

## **Diseño experimental.**

Para determinar si la vacuna antirrábica tipo Fz era capaz de promover la respuesta inmune humoral, celular y protectora en pollos, se formaron seis grupos con nueve pollos de ocho días de edad. Los grupos fueron los siguientes:

- Grupo 1. Vacuna de influenza experimental (VIA).
- Grupo 2. VIA más vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (Fz).
- Grupo 3. Vacuna de influenza aviar comercial (VC).
- Grupo 4. VC más Fz.
- Grupo 5. Testigo. Fz sola.
- Grupo 6. Testigo, Líquido alantoideo sin infectar (LASI).

Cada animal fue inyectado por vía subcutánea en la tabla del cuello con 0.5 ml de VIA, y lo correspondiente a 20 µg de vacuna Fz.

Por otro lado, para determinar la cantidad de proteína N del virus de la rabia, obtenida de cultivos celulares infectados (NC) más adecuada para promover la inmunidad humoral y celular, así como la protección al desafío, se formaron siete grupos con nueve pollos de ocho días de edad. Los grupos fueron los siguientes:

Grupo 1. VIA.

Grupo 2. VIA más 5 µg de NC.

Grupo 3. VIA más 10 µg de NC.

Grupo 4. VIA más 20 µg de NC.

Grupo 5. VC.

Grupo 6. Testigo, inoculados con 20 µg de NC sola.

Grupo 7. Testigo, inoculados con LASI.

Para determinar qué cantidad de proteína N del virus de la rabia recombinante expresada en un sistema baculovirus (N-Bac) era la más adecuada para promover la inmunidad humoral y celular, así como la protección al desafío, se formaron siete grupos con nueve pollos de ocho días de edad. Los grupos fueron los mismos que los descritos para la NC obtenida a partir de cultivos celulares infectados:

Grupo 1. VIA.

Grupo 2. VIA más 5 µg de proteína N recombinante (N-Bac).

Grupo 3. VIA más 10 µg de N-Bac.

Grupo 4. VIA más 20 µg de N-Bac.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Grupo 5. VC.

Grupo 6. Testigo, inoculados con 20 µg de N-Bac sola.

Grupo 7. Testigo, inoculados con LASI.

Cada animal fue inyectado por vía subcutánea en la tabla del cuello con 0.5 ml de VIA, y los µl correspondiente a 5, 10 y 20 µg de NC y N-Bac.

Cada experimento fue realizado en tres ocasiones diferentes. Las muestras de suero se tomaron a los días 0, 7, 14 y 21 días posvacunación. El desafío se llevó a cabo al día 21 post-vacunación por medio de la inoculación por vía intranasal de 10<sup>6</sup> DLEP<sub>50</sub>/0.2 ml de virus de IA de alta virulencia cepa A/Ck/Querétaro/14588-1995). Un último sangrado se realizó 12 días después del desafío (día 33 posvacunación).

#### **Evaluación de la respuesta humoral.**

La respuesta humoral fue detectada mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, según Alexander & Allan (135) y Randall et al (136). Brevemente, se prepararon diluciones dobles de suero usando PBS como diluyente en placas de 96 pozos (Corning Inc, Corning USA) a las que se agregaron 4 unidades hemoaglutinantes, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se agregaron eritrocitos de pollo al 0.5% en PBS. La aglutinación producida se evaluó mediante examen visual, después de 1 h.

#### **Evaluación de la inmunidad celular.**

La inmunidad celular fue evaluada mediante un ensayo de proliferación celular y mediante la detección por RT/PCR de la IL-2 de pollo, para ello se procedió a lo siguiente:

### *Extracción de linfocitos.*

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, usando tres animales vacunados con cada uno de los grupos descritos para cada una de las fuentes de la proteína N del virus de la rabia: Fz, NC y N-Bac. Los animales fueron sacrificados humanitariamente a los diez días posvacunación (pv).

Los bazos de los tres animales de cada grupo se obtuvieron en condiciones asépticas, se cortaron con tijeras estériles y se trituraron a través de una criba, empleando solución de Hanks (*In vitro*, D.F., México). Posteriormente, las células esplénicas se separaron usando Nycoprep 1.077 (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en medio RPMI 1640, adicionado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (estreptomicina 100 µg y penicilina 100 UI/ml). Como testigo negativo se usaron células de pollos sin vacunar y sin estimular *in vitro*, mientras que los testigos positivos fueron células de pollos sin vacunar estimuladas *in vitro* con 10 µg/ml de Concanavalina A. Las suspensiones de linfocitos provenientes de cada grupo fueron estimuladas *in vitro* con 5 µg de virus de la influenza aviar. Se utilizó una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo.

### *Ensayo de proliferación celular.*

Para determinar la proliferación celular se empleó el ensayo colorimétrico de MTT (sal de metil-tetrazolio), según lo describe Bounous et al (137). Brevemente, el ensayo se llevó a cabo de la manera siguiente: a cada pozo se agregaron 20 µl de una solución de MTT (5 mg/ml, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), se incubaron durante 4 h. Las placas de 96 pozos (Corning Inc, Corning USA) se

centrifugaron 10 min. a 400xg, el sobrenadante se descartó cuidadosamente y se agregaron 100  $\mu$ l de dimetil sulfoxido (DMSO) durante 10 min., en tanto que las placas permanecieron en movimiento orbital. La reducción del MTT se evaluó mediante un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. El índice de proliferación puede ser determinado usando únicamente una longitud de onda de 570 nm; sin embargo para mejores resultados se recomienda sustraer la DO obtenida al leer a 630nm a la de 570 nm (138).

*Establecimiento de un ensayo de RT/PCR para detección del gen de la (IL-2 de pollos.*

Para estandarizar este ensayo, se obtuvieron esplenocitos de pollo de la manera descrita previamente. Las células se sembraron a razón de  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  y se activaron con 5 y 10 y 30  $\mu$ g/ml de Concanavalina A, durante 24 y 48 h. Las células fueron incubadas a 40° C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se les retiró el medio de cultivo y se centrifugaron a 900g durante 10 min., el botón de células se congeló a -70° C hasta su uso.

*Extracción de ARN..*

El ARN total se extrajo utilizando el método del TRIzol (Invitrogen, Ca, USA), según el protocolo del laboratorio productor. El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (Genequant II, Pharmacia, NJ, USA) y se almacenó a -70° C.

*Síntesis del ADN complementario (ADNc).*

El ADNc fue obtenido agregando 2  $\mu$ g de ARN a un volumen total de 20  $\mu$ l de una mezcla que contenía 0.5 mM de oligo (dT) (Invitrogen, Ca, USA), 3 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP, 20 U de RNAsin (Promega, Wi, USA) y 200 unidades de M-MLV transcrptasa reversa (Invitrogen, Ca, USA).

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo agregando 100 ng de ADNc a una mezcla que contenía 10 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.001% de gelatina (Invitrogen, Ca, USA), 0.2 mM de cada uno de los dNTPs. Los iniciadores se agregaron a razón de 0.15 µM de cada uno. Como control se usó un segmento del gen de la β actina de pollo.

La secuencia de cada uno de los iniciadores se obtuvo con el programa OLIGO, el tamaño del producto y el número de acceso al banco de genes aparecen en la **Tabla 3.**

Todas las reacciones se llevaron a cabo usando el siguiente programa: 92° C, 75 seg, 1 ciclo; 92° C, 45 seg.; 50° C, 60 seg.; 72° C, 60 seg.; 30 ciclos; con una extensión final a 72° C, 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6%, los cuales se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (139).



**Tabla 3. Secuencias de los iniciadores utilizados para establecer el ensayo de RT/PCR para detectar los genes de la IL-2 y la  $\beta$ -actina de pollo (139).**

Citocina	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto
IL-2 (+)	(45) atg atg tgc aaa gta ctg atc (65)	Acceso GenBank AF017645
IL-2 (-)	(354) gat tta gac ccg taa gac tc t (375)	331 pb
IL-2 (+)	(249) agt gtt acc tgg gag aag t (268)	Acceso GenBank AF017645
IL-2 (-)	(689) tta ccg aca aag tga gaa tc (709)	469 pb
$\beta$ -actina (+)	(502) ctg gtc gta cca ctg gta ttg (523)	Acceso Genbank L08165
$\beta$ -actina (-)	(1048) cag gtg gcg caa tga tct tg (1028)	569 pb

#### **Análisis estadístico.**

Las diferencias entre pollos vacunados y controles se establecieron por la prueba exacta de Fisher. Para la proliferación celular, las DO se sometieron a análisis de varianza y al la prueba de Kruskal-Wallis . En el ensayo de protección, se utilizó la prueba de Chi-cuadrada (140).

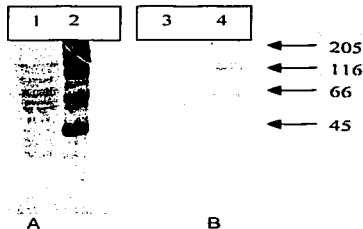
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **RESULTADOS**

### ***EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA NC DEL VIRUS DE LA RABIA, OBTENIDA DE CULTIVOS CELULARES INFECTADOS.***

Para la extracción de la NC, se empleó inicialmente la técnica reportada por Sokol (131). La *Figura 5*, muestra la NC obtenida por este procedimiento analizada en geles de poliacrilamida-SDS en donde se observan bandas inespecíficas. Por esta razón, se siguió el método reportado por Perrin (130), que se describe en la sección de Material y Métodos, en el cual durante la extracción se utiliza buffer NT, en vez de PBS para lavar los monoestratos y mantener al lisado celular obtenido en contacto con agua destilada fría durante una h, en vez de 10 min., como lo plantea el método de Sokol (130). La proteína N fluctúa entre 58 a 62 kDa. Posterior a la extracción se procedió a purificar a las proteínas obtenidas por ambos métodos usando CsCl.

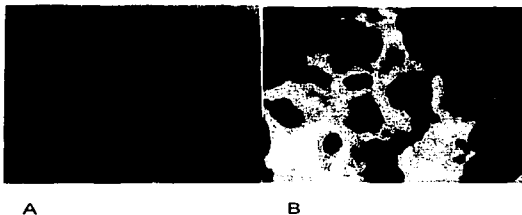
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 5.** Purificación de la proteína N del virus de la rabia, obtenida de cultivos celulares infectados, y análisis en gels de poliacrilamida-SDS al 12.5%. Panel A. Carril 1. Proteína N (NC) obtenida con el método reportado por Sokol (130). Panel B. Carril 3. NC producida mediante el método referido por Perrin. (131). Los pesos moleculares se incluyen en los carriles 2 y 4 .

### **OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA N RECOMBINANTE (N-Bac)**

Para identificar a la N-Bac expresada por un sistema Baculovirus (*Autographa californica*) en células Sf9, se procedió a realizar la prueba de inmunofluorescencia indirecta, empleando un anticuerpo monoclonal anti-N (donado por los Dres. Carlos y Cecilia de Mattos del CDC Ga, USA) y un anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (Sigma Chemical, Mo, USA), diluido en PBS con azul de Evans (0.05%). En la **Figura 6.A y B** se observan células de insecto sin infectar y células que expresaron la proteína N recombinante, respectivamente.



**Figura 6.** Identificación de la proteína N recombinante en células Sf9. Panel A. Células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) no infectadas por el Baculovirus recombinante que expresaba la proteína N del virus de la Rabia. 6.Panel B. Células Sf9 que expresan a la proteína N del virus de la Rabia, teñidas por inmunofluorescencia indirecta

La extracción de la N-Bac se efectuó empleando el método de Perrin (130), la purificación se realizó de la misma manera que para la proteína N obtenida de cultivos celulares infectados (Figura 7).

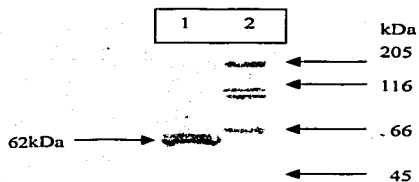


Figura 7. Purificación de la N-Bac y análisis en geles de poliácridamida-SDS al 12.5%. Carril 1. Proteína N obtenida de células de insecto Sf9, infectados por un sistema de expresión de Baculovirus; carril 2. Marcadores de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

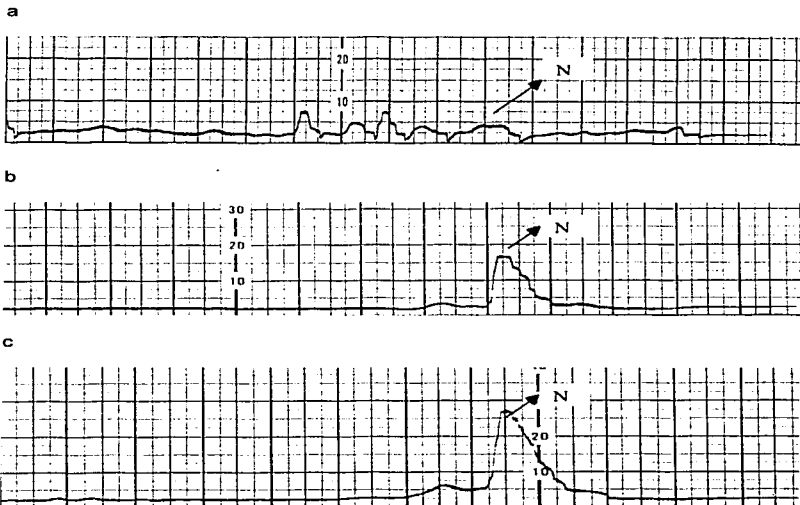
### **CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA N.**

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas mediante el método de Lowry et al (132). Se determinó que la proteína N extraída a partir de cultivos celulares infectados elaborada según el método de Sokol (131) obtuvo una concentración promedio de 1920  $\mu\text{g/l}$ , pero al analizar esta proteína presentaba múltiples bandas en el gel de poliacrilamida-SDS; mientras que la NC obtenida con la técnica reportada por Perrin (130) presentó un promedio de 800  $\mu\text{g/l}$ . En relación a la N-Bac, los lotes que se produjeron presentaron un promedio de 2400  $\mu\text{g/l}$ .

Además, como análisis complementario se realizó densitometría a tres lotes de proteína N. En la **Figura 8**, panel a se observa la densitometría realizada a un lote de NC obtenida por el método de Sokol (131); en el panel b de esta misma figura, se observa el resultado de la proteína N del virus de la rabia obtenida de cultivo celular infectado, en el panel c, se observa a la N-Bac, las dos últimas obtenidas por el método de Perrin (131).

Con este análisis se confirmó que el método de Perrin (131) resultó más útil para evaluar la acción de la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador, ya que se obtuvo en una forma más pura para su posterior cuantificación y adición a los lotes de vacuna contra IA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 8.** Análisis de pureza de la proteína N del virus de la rabia, realizado por densitometría. a. Proteína N obtenida de cultivos celulares infectados por el método de Sokol (131). b. Proteína N obtenida de cultivos celulares infectados por el método de Perrin (130). c. Proteína N recombinante (N-Bac), expresada por un baculovirus.

TRFIC CON  
FALLA DE ORIGEN

Para cuantificar a la proteína N se realizó una curva de albúmina bovina fracción V con cantidades conocidas de esta proteína, para posteriormente hacer comparaciones antes de adicionar las diferentes cantidades de proteína N que se probaron en las vacunas contra IA para estudiar su efecto como inmunomodulador (Figura 9).

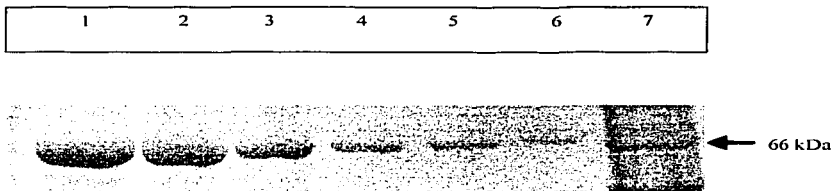


Figura 9. Cuantificación de albúmina bovina usando diferentes cantidades de la proteína. Carril 1, 65.5  $\mu\text{g}$ ; carril 2, 31.25  $\mu\text{g}$ ; carril 3, 15.62  $\mu\text{g}$ ; carril 4, 7.81  $\mu\text{g}$ ; carril 5, 3.9  $\mu\text{g}$ ; carril 6, 1.95  $\mu\text{g}$ ; carril 7, PM.

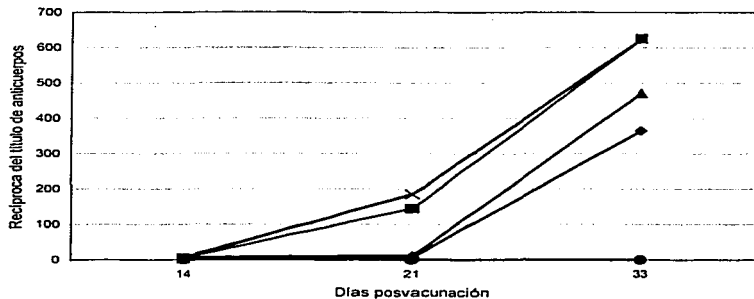
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**RESPUESTA INMUNE HUMORAL, CELULAR Y PROTECTORA DE UNA LA VACUNA TIPO Fz ADICIONADA A UNA VACUNA EXPERIMENTAL DE INFLUENZA AVIAR.**

***Respuesta inmune humoral.***

La respuesta de anticuerpos fue evaluada mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, en sueros obtenidos de pollos vacunados con los siguientes tratamientos: grupo 1, VIA; grupo 2 VIA más Fz; grupo 3 VC; grupo 4, VC más Fz ; grupo 5 Fz; grupo 6, LASI. Cada inmunógeno se inoculó a razón de 0.5 ml vía SC en la tabla del cuello en nueve pollos de ocho días de edad, realizando cada experimento por triplicado, por lo que los resultados se presentan con un total de 27 animales. Los sueros se obtuvieron a los días 0, 7, 14, 21 y 33 pv. El desafío se llevó a cabo al día 21 pv, con una cepa de alta virulencia A/CK/Qro/14588-1995. En la **Gráfica I** se observan los niveles de anticuerpos que se presentaron a partir del día 14 pv. Al día 21 pv, los títulos de anticuerpos de los grupos que fueron inmunizados con la VC (grupo 3) y la VIA más Fz (grupo 4) indujeron los títulos más altos ( $p < 0.05$ ). Después del desafío, los niveles de anticuerpos de todos animales inmunizados contra IA (grupos del 1 al 4) se incrementaron. La respuesta humoral de los grupos 2 (VIA más Fz) y 4 (VC más Fz) fue la mejor ( $p < 0.01$ ); seguida por los grupos inoculados con VIA (grupo 1) y con la VC (grupo 3) en comparación con los grupos testigo (5 y 6) ( $p < 0.05$ ). En los animales de los grupos testigo: grupo 5, Fz y grupo 6, LASI, no se detectaron anticuerpos específicos contra influenza aviar.



GRUPO 1 VIA	3	8	365	p<0.05
GRUPO 2 VIA + Fz	3.8	145*	625	p<0.01
GRUPO 3 VC	5*	11	471	p<0.05
GRUPO 4 VC + Fz	4.7*	185*	624	p<0.01
GRUPO 5 Fz SOLA	1	1	0	-
GRUPO 6 LASI	1	1	0	-

VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. Fz, Vacuna tipo Fuenzalida.  
VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

**Gráfica 1.** Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados con virus de influenza aviar. La VIA fue adicionada con una vacuna Fz. Los anticuerpos se detectaron a los 0, 7, 14, 21 y 33 días pv. \*p<0.05. El desafío se realizó el día 21 pv con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Querétaro/14588-1995).

### *Respuesta inmune celular.*

En cuanto a la inmunidad celular, en la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos midiendo la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico de MTT (reducción de la sal de metil-tetrazolio). Los linfocitos provenían de tres individuos de cada grupo y se obtuvieron al día 10<sup>pv</sup>. En la segunda columna se incluyen los resultados en valores de absorbancia, después de realizar el análisis estadístico se observó que existió una mayor proliferación celular entre los linfocitos obtenidos de los grupos vacunados contra IA (grupos del 1 al 4) y los linfocitos de los grupos testigo inyectados con Fz sola y LASI (grupos 5 y 6), respectivamente. Sin embargo, la proliferación de los linfocitos procedentes de bazos de pollos del grupo 1 inmunizados con VIA y los del grupo 3 vacunados con la VC fue estadísticamente menor ( $p < 0.05$ ) a la que presentó el grupo 2 (VIA más Fz) ( $p < 0.01$ ); mientras que el grupo 4, linfocitos de pollos vacunados con la VC adicionada con Fz como fuente de proteína N del virus de la rabia, presentaron una proliferación altamente significativa ( $p < 0.001$ ), con respecto a los linfocitos obtenidos de pollos inyectados con LASI (grupo 6).

Los resultados de la tercera columna representan el índice de estimulación (I. E.), que constituye el número de veces que se incrementa la proliferación celular de linfocitos activados en comparación con las células que no han sido activadas. Este índice se obtiene mediante la siguiente fórmula: [(absorbancia media del cultivo estimulado) – (absorbancia media del cultivo sin estimular)/absorbancia media del cultivo sin estimular] (137). El I. E. fue mayor para los linfocitos de los grupos de animales vacunados contra IA, siendo los grupos 2, VIA más Fz y 4 VC

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

más Fz, los que presentaron las proliferaciones más altas ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ ), respectivamente.

En este ensayo se realizó un control positivo empleando linfocitos obtenidos de pollo sin vacunar estimulados *in vitro* con Con-A ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) cuyas densidades ópticas (DO) ( $575/630$ ) fueron  $.343 \pm .0157$ .

Tratamientos	VA $\pm$ e.e.m <sup>A</sup> .	I.E <sup>B</sup>	p <sup>C</sup>
1. VIA	.461 $\pm$ .00956	2.01	0.05
2. VIA +Fz	.614 $\pm$ .00422	3.01	0.01
3. VC	.537 $\pm$ .00963	2.50	0.05
4. VC + Fz	.772 $\pm$ .0469	4.04	0.001
5. Fz	.271 $\pm$ .0312	0.77	-
6. LASI	.153 $\pm$ .00738	0	-

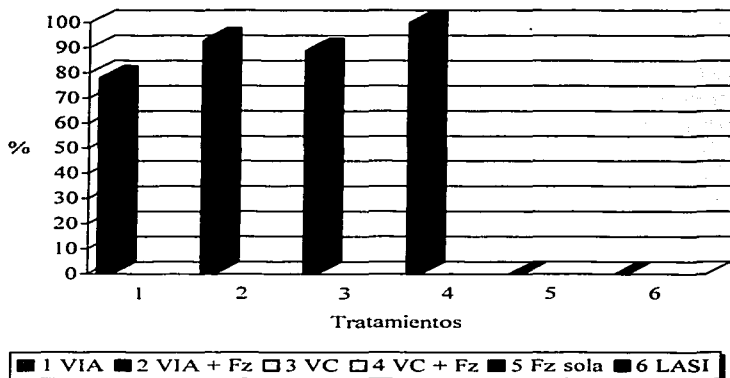
VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. Fz, Vacuna tipo Fuenzalida.  
VC, Vacuna comercial contra influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

Tabla 4. Proliferación de linfocitos de pollos vacunados contra influenza aviar, usando vacuna Fz como inmunomodulador. Los datos fueron tomados a los 10 días pv ( $n=3$ , cada muestra fue sembrada por triplicado). Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con virus de IA A. VA, Valores de absorbancia  $\pm$  e. e. m. error estándar de la media; B. I. E. Índice de estimulación. C. Diferencia estadística.

#### Respuesta inmune protectora.

En relación a la protección, la vacuna de IA presentó un 78% de protección, cuando se le adicionó la vacuna Fz, este porcentaje se elevó un 11%. En los animales inmunizados con la VC, la protección fue de 93%, al adicionarle la vacuna Fz la sobrevivencia fue de un 100%, es decir, el porcentaje de protección se incrementó un 7%. Aunque mediante la prueba de Chi-cuadrada no se

detectaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos vacunados. Concerniente a los controles negativos, todos los animales inyectados con la vacuna Fz y con el LASI (grupos 5 y 6) murieron entre los días 3 al 6 posdesafío, confirmando la virulencia de la cepa (Gráfica 2).



VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. Fz, Vacuna tipo Fuenzalida. VC, Vacuna comercial contra influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

**Gráfica 2.** Porcentaje de protección conferida a pollos vacunados contra influenza aviar, utilizando una vacuna antirrábica tipo Fuenzalida como inmunomodulador. El desafío se realizó al día 21 posvacunación con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Querétaro/14588-1995), por vía intranasal con  $10^6$  DLEP 50/0.2 ml. Los grupos testigo murieron entre los días 3 y 6 posdesafío.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

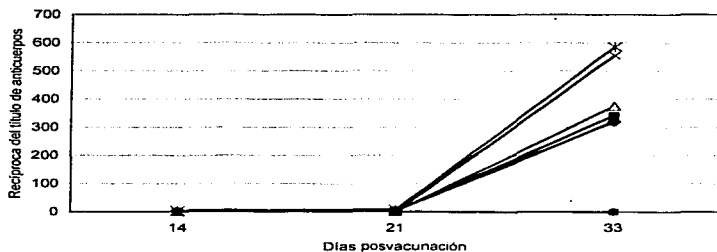
**RESPUESTA INMUNE HUMORAL, CELULAR Y PROTECTORA, PRODUCIDA POR LA ADICIÓN DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE LA RABIA (NC), OBTENIDA A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES INFECTADOS**

***Respuesta inmune humoral.***

La respuesta de anticuerpos fue evaluada mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, en sueros obtenidos de pollos vacunados con los siguientes tratamientos: grupo 1, VIA; grupo 2, VIA más 5 µg de NC; grupo 3, VIA más 10 µg de NC; grupo 4, VIA más 20 µg de NC; grupo 5 VC; grupo 6, 20 µg de NC; grupo 7, Líquido alantoideo sin infectar (LASI), que posteriormente serán mencionados como los tratamientos citados. Cada inmunógeno se inoculó a razón de 0.5 ml vía SC en la tabla del cuello en nueve pollos de ocho días de edad, realizando cada experimento por triplicado, por lo que los resultados se presentan con un total de 27 animales. Los sueros se obtuvieron a los días 0, 7, 14, 21 y 33 pv. El desafío se llevó a cabo al día 21 pv, con una cepa de alta virulencia A/Ck/Qro/14588-1995. Los resultados de la respuesta humoral utilizando diferentes cantidades de NC como fuente de virus rábico se observan en la Gráfica 3. Los niveles de anticuerpos se presentaron a partir del día 14 pv. La respuesta humoral producida por la VC a los días 14 y 21 pv fue la más elevada en comparación con los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). La cepa A/Ck/Querétaro/14588-1995 es la que emplea para la evaluación de lotes de vacunas comerciales en México. Al día 12 pd (33 pv) los

anticuerpos se detectaron en todos los grupos vacunados (1 al 5). Los grupos 1, AIV; 2, AIV más 5  $\mu\text{g}$  y 3 AIV más 10  $\mu\text{g}$  de NC, incrementaron sus niveles de anticuerpos con respecto a los testigos de manera significativa ( $p < 0.05$ ); sin embargo, los grupos 4 (VIA adicionada con 20 $\mu\text{g}$  de NC) y 5 (VC) resultaron con un título de anticuerpos aún más alto ( $p < 0.01$ ). En los grupos controles 6 y 7, correspondientes a los tratamientos que contenían sólo NC y LASI no se detectaron anticuerpos específicos contra IA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



GRUPO 1 VIA	2.5	5.3	320	P<0.05
GRUPO 2 VIA + 5 µg NC	1.6	3.2	341	P<0.05
GRUPO 3 VIA + 10 µg NC	1	2.9	375	P<0.05
GRUPO 4 VIA + 20 µg NC	1.1	2.5	555	P<0.01
GRUPO 5 VC	4.1*	8.5*	585	P<0.01
GRUPO 6 NC 20 µg	1	1	0	-
GRUPO 7 LASI	1	1	0	-

VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. NC, Proteína N del virus de la rabia obtenida de cultivo celular infectado. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

Gráfica 3. Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados contra influenza aviar, adicionando diferentes cantidades de NC del virus de la rabia como inmunomodulador. Los anticuerpos se detectaron a los días 0, 7, 14, 21 y 33 días posvacunación. \*p<0.05. Los animales fueron desafiados al día 21 pv con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Querétaro/14588-1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



En la **Tabla 5** se observa el resultado de la proliferación de linfocitos obtenidos de bazos de pollos, 10 días después de la vacunación con los tratamientos citados. Esta proliferación fue evaluada mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Como se muestra en esta tabla, los resultados se expresan en valores de absorbancia, así como en índices de estimulación. Todos los grupos de los pollos que incluían algún tratamiento con la vacuna contra influenza aviar mostraron una proliferación mayor a los grupos testigo. Los grupos 1, VIA; 2, VIA + 5  $\mu\text{g}$  de NC y 3, VIA + 10  $\mu\text{g}$  de NC, manifestaron una proliferación celular diferente a los grupos testigo ( $p < 0.05$ ); mientras que los grupos que incluyeron a la VIA adicionada con 20  $\mu\text{g}$  de NC y a la VC exhibieron una proliferación más elevada ( $p < 0.01$ ). Así mismo, se manifestó una proliferación específica al VIA, pues en los linfocitos del grupo 6, animales inyectados únicamente con NC no presentaron proliferación significativa al ser activados con el virus de IA *in vitro*. En este ensayo también se utilizaron dos controles adicionales, en el primero los linfocitos obtenidos de pollo sin vacunar fueron estimulados *in vitro* con Con-A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alcanzando valores de absorbancia de  $.302 \pm .0186$ , en el segundo linfocitos similares se estimularon *in vitro* con el virus de IA (5  $\mu\text{g}/\text{pozo}$ ) obteniendo una densidad óptica de  $280 \pm .159$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tratamientos	VA±e.e.m. <sup>A</sup>	I. E <sup>B</sup>	p <sup>C</sup>
1. VIA	.462 ± .112	2.27	0.05
2. VIA + 5 µg de NC	.327 ± .0847	1.32	0.05
3. VIA +10 µg de NC	.429 ± .117	2.04	0.05
4. VIA +20 µg de NC	.643 ± .137	3.56	0.01
5. VC	.674 ± .134	3.78	0.01
6. 20 µg NC	.219 ± .0378	0.55	-
7. LASI	.141 ± .0207	0	-

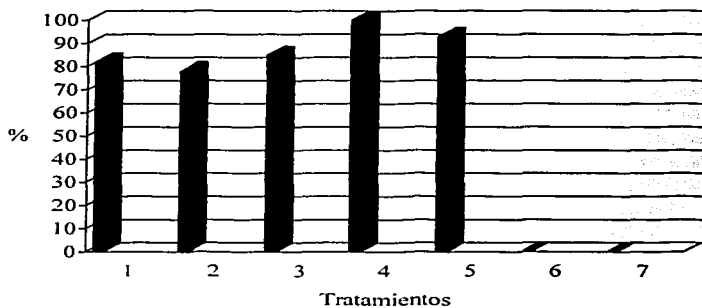
VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. NC, Proteína N del virus de la rabia obtenida de cultivo celular infectado. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

**Tabla 5.** Proliferación de linfocitos de pollo vacunados contra el virus de influenza aviar, usando NC del virus de la rabia como inmunomodulador. Los datos fueron tomados a los 10 días pv (n=3, cada muestra fue sembrada por triplicado). Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con virus de IA. A. VA±e.e.m. Valores de absorbancia±error estándar de la media (575/630nm). B. I.E. Índice de estimulación. C. Diferencia estadística.

#### *Respuesta inmune protectora.*

La inmunidad protectora se observa en la **Gráfica 4**, la mayor protección se presentó en los grupos que incluían la vacuna comercial con un 93% de sobrevivencia y con la vacuna de IA experimental adicionada con 20 µg de NC con un 100%, representando un 11 y un 18% de incremento en comparación con la VIA que no contuvo adyuvante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. NC, Proteína N del virus de la rabia obtenida de cultivo celular infectado. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido atantoideo sin infectar.

Gráfica 4. Porcentaje de protección conferida por una vacuna de influenza aviar, adicionada con diferentes cantidades de NC del virus de la rabia. El desafío se realizó al día 21 posvacunación con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Querétaro/14588-1995), por vía intranasal con  $10^6$  DLEP 50/0.2 ml. Los grupos testigo murieron entre los días 3 y 6 posdesafío.

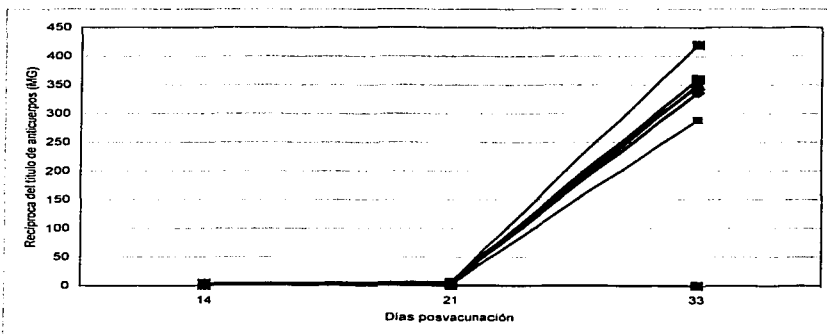
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**RESPUESTA INMUNE HUMORAL, CELULAR Y PROTECTORA, PRODUCIDA POR LA ADICIÓN DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE LA RABIA RECOMBINANTE OBTENIDA EN UN SISTEMA BACULOVIRUS**

*Respuesta inmune humoral.*

En la **Gráfica 5** se observa la respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados usando la proteína N producida en baculovirus como inmunomodulador. La VC promovió el título de anticuerpos más alto desde los 14 día en que comenzaron a detectarse los anticuerpos, en comparación con los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). Al día 21 pv no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos 1, VIA; 3, VIA + 5  $\mu$ g N-Bac; 4, 10  $\mu$ g N-Bac y 5 VC, en contraste con el grupo 2 donde la respuesta humoral fue la más baja ( $p > 0.05$ ). El desafío se realizó al día 21 pv con una cepa de alta virulencia (A/CK/Querétaro/14588-19/95). Posterior al desafío en todos los grupos inmunizados con la vacuna de influenza aviar se detectó un incremento de los títulos de anticuerpos, la respuesta sérica más alta ocurrió en los animales inmunizados con vacuna de influenza adicionada con 20  $\mu$ g de N-Bac (grupo 4) ( $p < 0.05$ ). En los grupos 6 (NC, 20  $\mu$ g de N-Bac) y 7 (LASI) no se detectaron anticuerpos específicos contra influenza.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



GRUPO 1 VIA	2.5	6*	337	P<0.05
GRUPO 2 VIA + 5µg N-Bac	2.4	2.9	289	P<0.05
GRUPO 3 VIA + 10 µg N-Bac	1.6	5.1*	350	P<0.05
GRUPO 4 VIA + 20 µg N-Bac	1.2	5.6*	420	P<0.01
GRUPO 5 VC	4.2*	5.5*	360	P<0.05
GRUPO 6 N-Bac, 20 µg	1	1	0	-
GRUPO 7 LASI	1	1	0	-

VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. N-Bac, Proteína N del virus de la rabia obtenida en un sistema de expresión en baculovirus. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido atantoideo sin infectar.

Gráfica 5. Respuesta de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación en pollos vacunados y desafiados contra influenza aviar, adicionando diferentes cantidades de N-Bac como inmunomodulador. Los anticuerpos se detectaron a los días 0, 7, 14, 21 y 33 días posvacunación. \*p<0.05. Los animales fueron desafiados al día 21 pv con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Querétaro/14588-1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Respuesta inmune celular.*

Los resultados de la proliferación celular detectada en los esplenocitos activados *in vitro* con virus de IA de los diferentes tratamientos se observan en la **Tabla 6**, en donde los grupos 1, VIA; 2, VIA + 5  $\mu\text{g}$  N-Bac y 3, VIA + 10  $\mu\text{g}$  N-Bac presentaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ). En los grupos 4 VIA + 20  $\mu\text{g}$  N-Bac y 5, VC, la proliferación celular fue la más alta ( $p < 0.01$ ) con respecto a los grupos 6, 20  $\mu\text{g}$  N-Bac y 7, LASI, que fueron los testigos. En este ensayo también se utilizaron dos controles adicionales, en el primero los linfocitos obtenidos de pollo sin vacunar fueron estimulados *in vitro* con Con-A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alcanzando valores de absorbancia de  $.347 \pm .0186$ , en el segundo linfocitos de pollo sin vacunar se estimularon *in vitro* con el virus de IA (5  $\mu\text{g}/\text{pozo}$ ) obteniendo una densidad óptica de  $260 \pm .059$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tratamientos	VA $\pm$ e. e. m. <sup>A</sup>	I. E <sup>B</sup>	p <sup>C</sup>
1. VIA	.428 $\pm$ .0762	2.12	P<0.05
2. VIA + 5 $\mu$ g N-Bac	.354 $\pm$ .0849	1.58	P<0.05
3. VIA + 10 $\mu$ g N-Bac	.428 $\pm$ .106	2.12	P<0.05
4. VIA + 20 $\mu$ g N-Bac	.687 $\pm$ .168	4.01	P<0.01
5. VC	.690 $\pm$ .138	4.03	P<0.01
6. 20 $\mu$ g N-Bac	.228 $\pm$ .0369	.66	-
7. LASI	.137 $\pm$ .0182	0	-

VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. N-Bac, Proteína N del virus de la rabia obtenida en un sistema de expresión en baculovirus. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

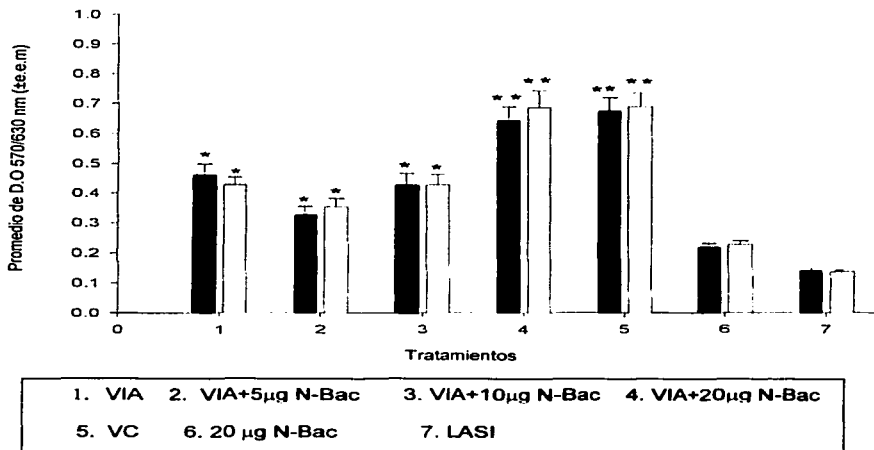
**Tabla 6.** Proliferación de linfocitos de pollo vacunados contra el virus de influenza aviar, usando N-Bac del virus de la rabia como inmunomodulador. Los datos fueron tomados a los 10 días pv (n=3, cada muestra fue sembrada por triplicado). Los linfocitos fueron estimulados *in vitro* con virus de IA. A. VA  $\pm$  e.e.m. Valores de absorbancia  $\pm$  error estándar de la media. B. Índice de estimulación. B. I. E. Índice de estimulación. C. Diferencia estadística

En la Gráfica 6 se presentan los resultados en valores de absorbancia de la proliferación celular detectada en los linfocitos provenientes de los animales inyectados con los tratamientos citados, como ya se mencionó, las células que provenían de animales vacunados con el virus de IA tuvieron una proliferación más alta que los grupos controles que incluían el grupo 6 de animales inyectados con 20  $\mu$ g de NC ó 20  $\mu$ g de N-Bac y el grupo 7, animales que habían sido inyectados con líquido alantoideo sin infectar. El aumento de proliferación fue notable (p<0.01) en los grupos 4, linfocitos de animales inyectados con la vacuna de IA adicionado con 20  $\mu$ g de proteína N (NC ó N-Bac) y el grupo 5, linfocitos de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

animales inmunizados con la vacuna comercial que contiene un adyuvante oleoso.

La proliferación al usar NC ó N-Bac no fue diferente ( $p>0.01$ ).



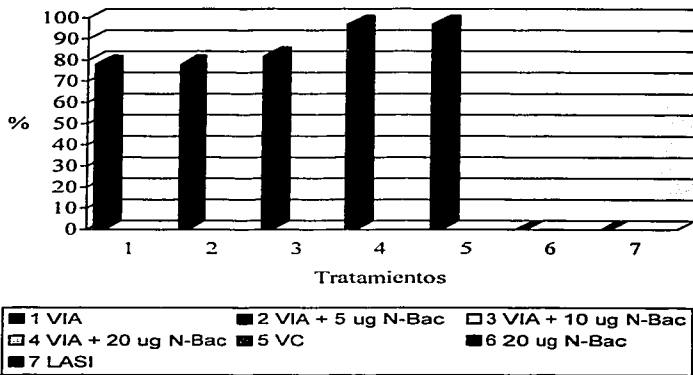
**Gráfica 6.** Comparación de la proliferación de linfocitos de animales vacunados con virus de influenza aviar, adicionado con dos diferentes fuentes de proteína N del virus de la rabia, utilizada como inmunomodulador. Las barras blancas representan la proliferación producida en el ensayo donde se empleo la NC obtenida de cultivos celulares infectados. Las barras negras corresponden a los resultados obtenidos con el ensayo donde se utilizó la proteína N elaborada en un sistema de baculovirus recombinante. Los esplenocitos de cada uno de los ensayos fueron estimulados *in vitro* con el virus de la IA (5 µg/pozo). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



*Respuesta inmune protectora.*

El ensayo de protección correspondiente a la utilización de N-Bac como inmunomodulador se muestra en la Gráfica 7 donde se observan los porcentajes de sobrevivencia que fluctuaron desde 78% en los grupos 1, VIA y 2, VIA + 5 µg de N-Bac y 82% para el grupo 3, 10 µg de N-Bac . Los grupos 4, VIA + 20 µg de N-Bac y 5, VC, presentaron el mayor porcentaje de protección al sobrevivir el 97% de los pollos desafiados para ambos grupos, representando un incremento de 19% en comparación con la VIA a la cual no se le adicione ningún inmunomodulador. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p>0.05$ ). Todos los individuos de los grupos controles, 6, 20 µg de N-Bac y 7, LASI, murieron entre los días 3 al 6 pd.



VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. N-Bac, Proteína N del virus de la rabia obtenida en un sistema de expresión en baculovirus. VC, Vacuna comercial de influenza aviar, LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

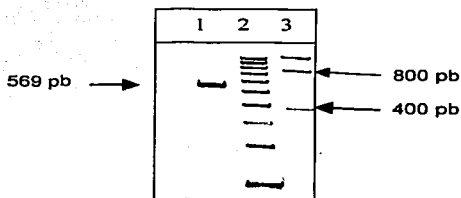
**Gráfica 7.** Porcentaje de protección conferida por una vacuna de influenza aviar, adicionada con diferentes cantidades de N-Bac del virus de la rabia El desafío se realizó al día 21 pv con una cepa altamente virulenta (A/Ck/Querétaro/14588-1995)(H5N2), por vía intranasal con  $10^6$  DLEP<sub>50</sub>/0.2ml. Los grupos testigo murieron entre los días 3 y 6 posdesafío.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ESTABLECIMIENTO DE LA PRUEBA DE RT/PCR PARA LA DETECCIÓN DEL ARNm DE UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA IL-2 DE POLLO.**

En el transcurso de este estudio se estandarizó un ensayo de RT/PCR para detectar el ARNm de la IL-2, así como el de la  $\beta$ -actina empleada como gen constitutivo (control). En la sección de Materiales y Métodos se describen las condiciones y el programa que resultaron idóneos para el establecimiento de esta técnica.

En la **Figura 10** se observa un producto de amplificación de 569 pb, que corresponde al gen de la  $\beta$ -actina de pollo. El producto de amplificación fue corrido en un gel de acrilamida al 6% y teñido con bromuro de etidio.

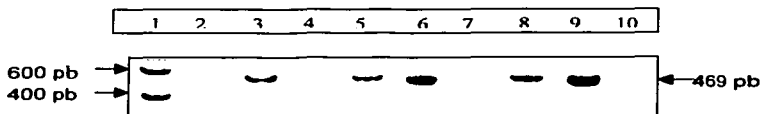


**Figura 10.** Detección mediante RT/PCR del ARNm de  $\beta$ -actina de pollo obtenida de linfocitos activados con 10  $\mu$ g/ml de Concanavalina-A durante 24 horas. En el carril 1, Gen de la  $\beta$ -actina; carril 2, marcadores de peso molecular de 100 pb; carril 3, marcadores de bajo peso molecular.

Para estandarizar la RT/PCR para la detección del ARNm de la IL-2 de pollo se probaron en un inicio un par de cebadores cuyo producto esperado era de 331 pb, sin embargo, una vez establecidas tanto las condiciones como el programa el producto que se obtenía era de aproximadamente 368 pb, por este motivo se decidió diseñar otro par de cebadores cuyo producto esperado era de 469 pb. Para estandarizar las condiciones óptimas se evaluaron tres diferentes temperaturas de alineación: 45, 50 y 55° C, seleccionándose la de 50° C, pues fue la que mostró mejor la diferencia de síntesis de ARN entre los linfocitos activados con Con-A y los controles (linfocitos sin activar) (Figura 11).

Al ensayar con dos diferentes cantidades de linfocitos, se estableció que la banda obtenida era más definida al usar  $1 \times 10^7$  células, y que el tiempo de activación adecuado fue de 24 h. Cabe mencionar que al momento en que este estudio se llevo a cabo, no existía ninguna publicación donde se reportara algún ensayo relacionado con el RT/PCR de estas moléculas en aves.

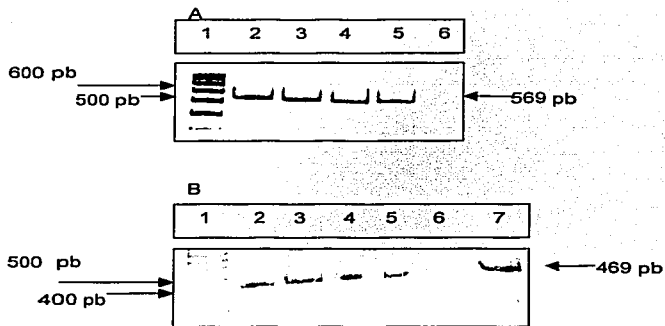
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 11.** Expresión del ARNm del gen de la IL-2 de pollo, a diferentes temperaturas de alineación. En el gel se observa la temperatura de alineación óptima para establecer la diferencia de síntesis de ARNm entre linfocitos activados y sin activar. Carril 1, marcadores de bajo peso molecular; carriles 2, 5 y 8, productos de PCR obtenidos de linfocitos no activados con Con-A a temperaturas de alineación de 45, 50 y 55° C, respectivamente; carriles 3, 6 y 9 productos de PCR de linfocitos de pollo activados con Con-A, 10 µg/ml 24 h a temperaturas de alineación de 45, 50 y 55° C, respectivamente; carriles 4, 7 y 10 contenían agua.

Para poder establecer la cinética de síntesis de ARNm, se eligieron los tratamientos de: VIA, VIA más 20 µg de N-Bac, VC y linfocitos de pollo sin inmunizar, además se incluyó un testigo positivo de linfocitos activados con 10 µg de Con-A. Una vez establecidas las condiciones idóneas para llevar a cabo la RT/PCR, se procedió a extraer ARN de los tratamientos detallados en el párrafo anterior. Estos grupos se seleccionaron de acuerdo a los resultados de la proliferación celular obtenida por el ensayo del MTT. El grupo de VIA más 20 µg de N-Bac se eligió, debido a que en el ensayo de proliferación celular no existieron diferencias estadísticas entre la proliferación obtenida entre la NC y la N.Bac En la **Figura 12** panel A., se observa el nivel del ARNm del gen de la β-actina, usado como control. En la **Figura 12**, panel B se muestra la síntesis de ARNm del gen de

la IL-2 obtenida de linfocitos de bazos de pollos a los diez días posvacunación con los tratamientos ensayados.

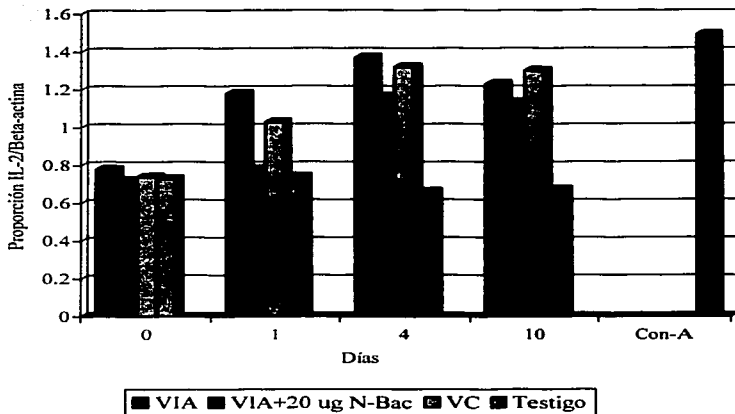


**Figura 12.** Detección del ARNm del gen de la  $\beta$ -actina y la IL-2 de pollo, obtenido a los 10 días posvacunación. Panel A. Detección del gen de la  $\beta$ -actina en geles de acrilamida. Carril 1, pesos moleculares de 100 pb; carril 2, ARNm de linfocitos obtenidos de pollos vacunados con VIA más 20  $\mu$ g de N-Bac; carril 3, ARNm de linfocitos de pollos vacunados con VC; carril 4, ARNm de linfocitos de pollos vacunados con VIA; carril 5, ARNm de linfocitos de pollos no vacunados; carril 6, agua. Panel B. Detección del gen de la IL-2 de pollo. Los carriles 1 a 6 son los mismos que para el panel A; carril 7, ARNm de linfocitos obtenidos de pollos sin vacunar estimulados *in vitro* con 10  $\mu$ g/ml de Con-A, durante 24 hrs.

Para cuantificar el nivel de cada uno de los productos de PCR obtenidos de los diferentes grupos, las imágenes fueron documentadas en un analizador de geles Edas-120 (Kodak) y su intensidad fue determinada utilizando el programa del National Institutes of Health ([www.cdc.gov/iceec](http://www.cdc.gov/iceec)). En la **Gráfica 8** se observan la expresión relativa del ARNm de cada una de las muestras tomadas a los días 0, 1,

4 y 10 pv de los pollos inmunizados con los diferentes tratamientos, así como de células de animales sin vacunar y sin activar *in vitro* (control negativo), así como de linfocitos activados con 10 µg de Con-A (control positivo). La expresión relativa del ARNm de cada una de las muestras se representaron como la proporción ó relación de la intensidad de la banda del producto del RT/PCR de la IL-2 sobre el producto del RT/PCR de la  $\beta$ -actina. Como puede observarse, las vacunas contra influenza aviar tanto experimental como comercial incrementaron la expresión del gen de la IL-2 en comparación con el testigo, llegando a su máximo al día 4 pv y se mantuvo cercano al día 10 pv. La expresión de la IL-2 de la vacuna contra influenza aviar adicionada con la N-Bac fue menor el día 1 en comparación con el comportamiento de los otros tratamientos; al día 4 y 10 el radio de expresión se incrementó a niveles similares a la de los linfocitos obtenidos con las vacunas de IA (VIA) y la VC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



VIA, Vacuna de influenza aviar experimental. N-Bac, Proteína N del virus de la rabia obtenida en un sistema de expresión en baculovirus. VC, Vacuna comercial de influenza aviar. Testigo. LASI, Líquido alantoideo sin infectar.

**Gráfica 8.** Cinética de la síntesis del ARNm de la IL-2 de pollo, obtenida de linfocitos de animales vacunados con los tratamientos citados. Los linfocitos fueron aislados a los 1, 4 y 10 días pv, de tres diferentes animales. El control positivo fueron linfocitos activados con 10  $\mu$ g/ml de Con-A durante 24 h.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## DISCUSIÓN

En este estudio se investigó el papel de la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador, adicionado a una vacuna inactivada contra la influenza aviar, evaluando la respuesta inmune humoral, celular y la protección ante un desafío con una cepa de alta virulencia. Las condiciones de inmunización empleadas fueron las utilizadas para la vacunación y constatación de biológicos contra el virus de IA a nivel de campo. La proteína N fue obtenida de tres diferentes fuentes: de una vacuna antirrábica tipo Fuenzalida (Fz) elaborada en cerebros de ratones lactantes, de nucleocápside obtenida de cultivo de células BHK-21 infectado con virus de la rabia (NC), y proteína N expresada en un sistema de baculovirus recombinante (N-Bac).

La vacuna tipo Fz es la responsable de buena parte del control de la rabia en el ser humano, aunque en México el último lote se produjo en 1992, existen aún varios países en desarrollo donde se produce y experimenta con ella, su principal inconveniente es producir en algunos casos el síndrome de Guillian-Barré (141, 142, 143, 144). Como se observa en la **Grafica 1**, el adicionar vacuna tipo Fuenzalida a la vacuna experimental y comercial contra IA produjo un incremento en el título de anticuerpos, esto confirma reportes anteriores en el sentido de que la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida es un adyuvante para la respuesta humoral (145).

Al agregar la vacuna tipo Fz, a las vacunas contra el virus de IA, tanto experimental como comercial (**Grafica 2**) la protección aumento al menos un 11%, de manera similar De Paz et al (145) al añadir una dosis de vacuna tipo Fuenzalida a un inmunógeno contra el virus de Parainfluenza-3 (PI-3) bovina, evaluado en hámsters obtuvieron un incremento en la respuesta humoral y en la protección contra un desafío vía aérea. Estas observaciones podrían resultar muy

útiles en países como Brasil donde aún se utilizan este tipo de vacunas (146, 147, 148).

En relación al ensayo de proliferación celular (**Tabla 1**), el tratamiento que mejores resultados produjo fue el de vacuna comercial de IA más la vacuna Fz. Existen estudios por separado sobre inmunidad celular para el virus de la influenza aviar, evaluándola mediante ensayos de citotoxicidad (116). En el caso de vacunas antirrábicas tipo Fz, se han empleado ensayos de proliferación celular al activar con virus de rabia a linfocitos de bazo provenientes de ratones inmunizados contra este agente (141). Los resultados de proliferación celular encontrados en la presente investigación, pudieran explicarse por la abundancia de la NC en vacunas de este tipo (86).

La proteína N pura se obtuvo al utilizar el método descrito por Perrin (130) ya que en nuestras manos cuando se empleó el método reportado por Sokol (131) la pureza de la NC no fue adecuada, pues en el gel se apreciaban varias bandas (Figura 5, panel A). Ambos procedimientos son muy similares, con la diferencia que en el primero, el botón de células es sometido a agua destilada fría durante una hora, mientras que en el otro el botón sólo se mantiene en contacto con agua 10 min, lo que podría ocasionar que las membranas celulares se rompan más eficientemente, lo que provocaría la liberación de la proteína N de una manera más eficiente. Por otro lado, para la purificación de la N-Bac, se han utilizado los métodos de cromatografía de alta presión y centrifugación en gradientes de sacarosa, respectivamente (149, 150); sin embargo en este estudio se utilizó la centrifugación isopícnica con cloruro de cesio, empleada también para obtener la NC.

Para cuantificar la proteína N (NC y N-Bac) se utilizó la densitometría de la proteína separada por lectroforesis en gel de poliacrilamida, que se ha reportado

como un método rápido, fácil y económico para cuantificar proteínas, e incluso se empleó también para cuantificar proteína N de virus de la rabia (134, 149, 151). La utilización de una proteína recombinante (N-Bac) en este estudio se debió a que este sistema de expresión presenta varias ventajas, algunas de las cuales son: 1) este virus es patógeno sólo para insectos, de este modo se elimina el peligro de infección al laboratorista, 2) produce una alta expresión de la proteína de interés (152), lo cual fue confirmado en este estudio pues de cada uno de los dos lotes producidos se obtuvo un promedio de 2400  $\mu\text{g/l}$  de cultivo estacionario, mientras que de la NC obtenida en células BHK-21 se consiguieron 800  $\mu\text{g/l}$ , y 3) a diferencia de otros sistemas de expresión conserva la propiedad de producir modificaciones post-traduccionales.

En relación al efecto detectado en la inmunidad humoral por la NC y la N-Bac, Fu et al (153) mencionan que al comparar la inmunogenicidad en ratones valorada al inocular intraperitonealmente diferentes cantidades (0.2, 1 y 5  $\mu\text{g}$ ) de NC y proteína N recombinante producida en baculovirus acompañadas con adyuvante completo de Freund, la respuesta de anticuerpos usando 5  $\mu\text{g}$  fue ligeramente menor en los sueros de los animales inmunizados con esta última molécula. En contraste, la sobrevivencia se incremento a 90% usando la proteína N recombinante, en comparación con la NC que protegió un 80%. Al realizar un ensayo de estimulación de hibridomas de células T específicas para la proteína N del virus de la rabia usando la técnica de incorporación de la timidina tritiada, no encontraron diferencias entre ambas fuentes de proteína N. En esta tesis también se analizaron los mismos parámetros (inmunidad humoral, celular y protección) pero empleando estas dos proteínas como inmunomoduladores hacia un virus no relacionado (IA). A pesar de ello la protección fue de 100% al emplear la NC, y de 97% usando la N-Bac, lo cual no implica una diferencia significativa. Este resultado puede explicarse por el hecho de que las proteínas recombinantes

purificadas conservan sus propiedades antigénicas e inmunogénicas similares a las de la NC (149).

La inmunidad humoral evaluada en este estudio, reveló que todos los animales de los grupos vacunados contra IA indujeron anticuerpos que se detectaron a partir del día 14 pv; mientras que en los animales de los grupos control no se detectaron anticuerpos específicos contra influenza. Sistemáticamente, la mayor respuesta sérica detectada en esta investigación fue la producida por la vacuna comercial, un producto inactivado y emulsionado en aceite. Mahan et al (154) mencionan que con el uso de una vacuna emulsionada contra *Cowdria ruminatum* la protección no correlaciona con la respuesta humoral sugiriendo que la inmunidad celular es la principal involucrada en la protección contra este agente. Aucouturier et al (1), mediante citometría de flujo detectaron un incremento significativo de CD8+ en células obtenidas después de la inmunización con una vacuna emulsionada, por ello sugieren la participación de este tipo de productos en la inducción de la respuesta protectora por células T citotóxicas. En México, el uso de la vacuna emulsionada contra IA, junto con medidas de bioseguridad adoptadas en las granjas afectadas durante el brote de 1995, fueron los principales factores responsables de haber eliminado el virus de alta patogenicidad que afectó a la avicultura del país (112). De igual modo, se reporta la efectividad de estos inmunógenos para prevenir las pérdidas ocasionadas por influenza aviar, debido a un alto nivel de protección (90 a 100%) (120, 154, 155). Estos resultados coinciden con lo observado en este trabajo, pues las evaluaciones realizadas muestran a la vacuna comercial como un producto que protegió más del 90% (93 y 97%, respectivamente).

Por otro lado, convencionalmente, un bajo título de anticuerpos indicaría una baja o nula protección, sin embargo, aunque en este estudio se promovieron bajos títulos de anticuerpos después de la vacunación, muchos de los animales

quedaron protegidos. Esta misma situación ha podido observarse con diferentes virus, como el de la rabia (91), Newcastle (157) y con el virus de influenza aviar en donde se han realizado diferentes experimentos evaluando tanto la seroconversión como la protección conferida por vacunas oleosas contra este virus (158, 159, 160). Esta condición puede relacionarse con la masa antigénica presente en las vacunas inactivadas contra influenza aviar (161). Asimismo, estos resultados podrían relacionarse con la edad de los individuos utilizados, ya que tanto en jóvenes como en viejos, la respuesta humoral puede ser un pobre indicador de la eficacia de las vacunas (161, 162, 163, 164, 165). En el presente trabajo, se usaron individuos jóvenes pues se siguió el calendario que se utiliza para evaluar vacunas contra influenza aviar en México para pollos de engorda (158, 159).

Otra observación acerca de los resultados obtenidos en la evaluación de la inmunidad humoral, es que ésta puede estar asociada con la especie animal, a la par de este estudio se realizó otro, cuyo objetivo fue evaluar la respuesta de anticuerpos producida con la proteína N del virus de la rabia adicionada en diferentes cantidades a una vacuna experimental de Parainfluenza-3 bovina evaluada en hámsters. En el experimento citado, el título de anticuerpos más alto fue el promovido por el grupo vacunado contra PI-3 adicionado con 20 µg de NC, el grupo inyectado con 20 µg de NC tres días antes de la vacunación, y el inoculado con 20 µg de N-Bac más la vacuna experimental de PI-3, estos grupos resultaron mejores en comparación a la vacuna de PI-3 sin proteína N y a la comercial; los anticuerpos se detectaron desde los 7 días posvacunación (21). Astoul et al (20), reporta en ratones un incremento dramático de anticuerpos detectados por la técnica de IH a partir del día 7 cuando aplicaron 20 µg de NC adicionados a una vacuna de influenza humana, estos autores comprobaron en esta especie el estímulo de células Th2 debido a la NC. Otros autores, al emplear

2 µg de NC, observaron que el aumento de la respuesta humoral no fue diferente al aplicar la vacuna de influenza sola, sugiriendo la existencia de una respuesta dosis dependiente (95). Concerniente a la dosis, existen publicaciones que difieren de lo anterior, Mata (166) señala que al usar 20 µg de NC en ratones lactantes, éstos mueren; en contraste, al inicio de este estudio se utilizaron dosis de 40, 60 y 120 µg de NC adicionadas a la vacuna contra IA, dosis con las cuales no se presentaron muertes; sin embargo, en vez de incrementar la respuesta inmune, ésta disminuyó (Loza-Rubio, datos no publicados), esto podría ser explicado por la acción de células supresoras generalmente inducidas por altas concentraciones de antígeno. Un mecanismo de acción de estas células es por un exceso en la producción de citocinas inhibitorias, como lo es el TGF-β, un poderoso inhibidor de la proliferación de las células T y B, de esta manera un exceso de TGF-β puede inhibir la respuesta inmune, y activar a las células supresoras. Además algunas de ellas pueden matar a otras células involucradas en la respuesta inmune (12). Por otro lado, tanto linfocitos CD8+ y algunos CD4+ pueden lisar células blanco unidas a antígenos estimulados en asociación con moléculas del CPH (clase I y II, respectivamente). Esta lisis resulta en interacciones de Fas ligando y Fas y en la secreción de citocinas como el TNF (12). Como es sabido las células linfoides expresan Fas, y en linfocitos los niveles de esta proteína incrementa la estimulación por el antígeno (12).

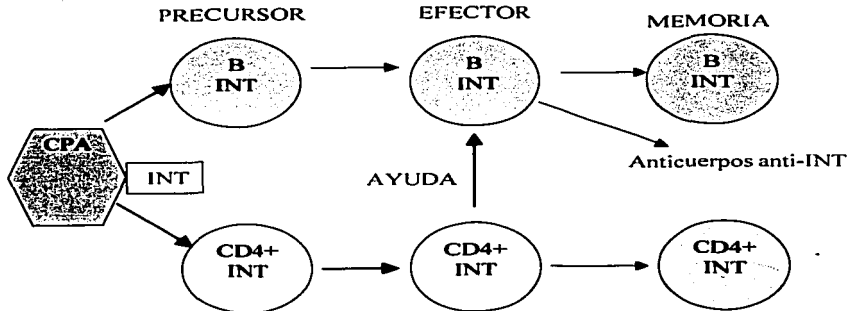
En el presente estudio, la inmunidad protectora conferida por cada uno de los tratamientos fue evaluada al desafiar a todos los animales con una cepa de alta virulencia (A/Ck/Queretaro/14588-19/1995) (H5N2), la cual es empleada en la evaluación de vacunas comerciales en México (159, 167, 168). Después del desafío, la vacuna experimental fue efectiva por sí misma presentando un rango de protección de 78 a 82% lo cual esta dentro de los requisitos mínimos para lotes de vacuna (169); respecto a los grupos adicionados con 5 y 10 µg de proteína N,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

se observó un aumento en la protección de acuerdo con la dosis, pues los tratamientos que presentaron los valores más altos de sobrevivencia fueron los que contuvieron 20  $\mu$ g de proteína N, siendo de 100 y 97% para la NC y para la recombinante, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fu et al (153), aunque este grupo obtuvo una mejor sobrevida usando la recombinante, con un 90%, que con la NC con un 80%. Como ya se mencionó, estos trabajos fueron realizados con virus de la rabia y virus relacionados, y no con virus no relacionados como en el presente trabajo.

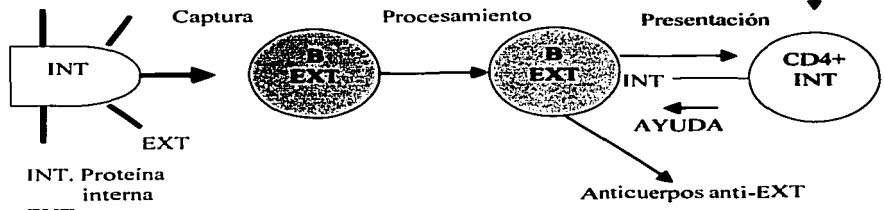
No obstante, de una baja respuesta humoral detectada hasta el día 21, posterior al desafío, la tasa de anticuerpos séricos se incrementó posiblemente debido al mecanismo conocido como ayuda intermolecular o intraestructural (cross help), descrito para el virus de influenza humana, y más recientemente para la proteína VP6 de rotavirus (170, 171, 172). El principio de este mecanismo es que las células T de memoria reconocen algún componente interno del virus, que es capaz de cooperar con las células B específicas para la superficie de una proteína, y así estimular la producción de anticuerpos dirigidos contra la superficie de esta molécula (Figura 13).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



INMUNIZACIÓN con antígeno viral interno

INFECCIÓN con la partícula viral



INT. Proteína interna  
EXT. Proteína

Figura 13. Mecanismo de ayuda intermolecular. Drings (150).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



En relación a la inmunidad celular, se utilizó el ensayo colorimétrico del MTT basado en la reducción mitocondrial de la sal soluble de tetrazolio por las células viables. El producto reducido, formazán, es disuelto y medido por espectrofotometría, bajo estas condiciones la cantidad de formazán obtenido es proporcional al número viable de células. Este método ha demostrado una buena correlación con el método de incorporación de la  $[^3\text{H}]$  timidina tritiada y presenta la ventaja de no requerir radioisótopos, o contador gamma, pudiendo establecerse en cualquier laboratorio (137, 173, 174, 175), como se demostró en este estudio.

En esta investigación, la blastogénesis fue mayor en los linfocitos de los animales vacunados contra influenza aviar, que en los de los testigos inyectados con proteína N y con líquido alantoideo sin infectar. Los grupos con mayor proliferación fueron los inmunizados con la VIA más 20  $\mu\text{g}$  de proteína N, sin importar el origen de la misma, así como con la vacuna comercial emulsionada. Esto sugiere la presencia de linfocitos activados en el bazo, pues la inmunización desencadena numerosos mecanismos de amplificación, que incrementan el número de células respondedoras al antígeno (12). La proliferación celular fue específica para el virus de influenza, pues los linfocitos de pollos controles no proliferaron significativamente al activarlos *in vitro* con virus de IA.

Por otra parte, aunque los SAg's son efectivos a muy bajas concentraciones e inducen una fuerte respuesta en rango nanomolar, lo cual los hace potentes mitógenos (41); el SAg del virus de la rabia ha sido propuesto como un mitógeno débil *in vitro*, pues la adición de la proteína N a linfocitos obtenidos de ratones sin inocular no fue suficiente para provocar su proliferación (20, 22). Por el contrario, en presencia de linfocitos sensibilizados por algún antígeno, la proliferación aumenta tanto en humanos como en ratones (95). La proteína N presenta la propiedad de no tener secuencias en común con otros SAg's, y activar un número restringido de  $V\beta$ , de este modo sólo estimula la respuesta inmune específica. Así

mismo, la proteína N de rabia se diferencia de otros SAG's por su capacidad de estimular una respuesta Th2 en ratones y en humanos. Según estos autores, ésta propiedad podría explicar su capacidad para inducir interacciones de células B-T, conduciendo a la producción de anticuerpos en ratones, por ello lo proponen como un inmunoestimulante (20, 99). Sin embargo, en pollos no pudo verse claramente la respuesta humoral, sino hasta después del desafío, a diferencia de lo observado en hámsters por De Paz et al (145) y Loza-Rubio et al (21). En dichos experimentos se notó una rápida y contundente respuesta humoral. Esto podría atribuirse a diferencias existentes entre esta especie y los mamíferos (176). Actualmente, SAG's bacterianos clasificados como potentes están siendo evaluados como adyuvantes con buenos resultados, por ejemplo, el uso de la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) inyectada 1 y 2 días antes de aplicar una vacuna contra *L. monocytogenes*, demostró conferir protección a ratones desafiados contra esta bacteria, pero no contra *S. pyogenes* (177). Recientemente, Gampfer et al (178) proponen la utilización de TSST-1 como inmunógeno para proteger del síndrome del choque tóxico, al probar en conejos diferentes candidatos a vacuna, los animales quedan protegidos contra una dosis letal de este SAG. Estos eventos pueden explicarse porque la activación de células T autorreactivas es necesaria, pero no suficiente para desarrollar un evento autoinmune, otros requisitos para ello son: existencia de una suficiente expansión clonal de las células T autorreactivas., inducción de un fenotipo funcional (por ejemplo: perfil de citocinas) que haga a las células T patógenas., entrada de células T autorreactivas hacia el órgano blanco, y suficientes niveles de expresión de moléculas del CPH y moléculas coestimuladoras sobre células presentadoras de antígeno en el órgano blanco (179).

Otras moléculas importantes para la respuesta inmune son las citocinas que son mediadores solubles responsables de la expansión clonal y subsecuente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

diferenciación de un relativo pequeño número de leucocitos en una población respondedora a un antígeno dado durante una respuesta inmune. Estos mensajeros solubles juegan un papel crítico en la diferenciación de mecanismos efectores requeridos para erradicar los microorganismos invasores del huésped. Aunque mucha información se ha obtenido usando líneas celulares, la expresión de citocinas puede ser observada en células tomadas directamente del huésped. Sin embargo, es evidente que existen numerosos obstáculos para lograr información *in vivo* sobre la expresión de estas moléculas, a menudo los genes de las citocinas son expresados a bajos niveles por el número limitado de células que pueden obtenerse de un huésped infectado. En aves sólo ocho citocinas han sido caracterizadas a nivel molecular, el IFN tipo I y II, el MGF, el TGF- $\beta$ , la IL-6, la IL-1 $\beta$ , el IFN $\gamma$  y la IL-2 (180, 181, 182, 183, 184, 185, 186). Los principales problemas para clonar citocinas de aves es que existe poca o no hay reacción cruzada entre sus anticuerpos y los de los mamíferos. De hecho, ninguna interleucina de la rama Th2 (IL-4, IL-5 ó IL-10) ha sido clonada en aves (187).

Ante la imposibilidad de realizar un ensayo biológico, para identificar la cantidad de IL-2 producida por la proteína N del virus de la rabia, la cual se reporta como un inductor débil de esta citocina, en comparación con SAg's bacterianos (22, 99), en este estudio se estandarizó un ensayo de RT/PCR para detectar la expresión del ARNm del gen de la IL-2 de pollo, con la finalidad de analizar su cinética de expresión en linfocitos de pollos inmunizados contra la vacuna experimental contra IA, la VIA adicionada con 20  $\mu$ g de N-Bac y una VC. Para ello se diseñaron iniciadores de secuencias específicas para la  $\beta$ -actina y la IL-2 de pollo. En el desarrollo de este estudio se observó que el número de células es crítico para poder amplificar la expresión del gen de la IL-2. Al tratar de utilizar tratamientos con un millón de células por vial, la amplificación no fue eficiente, situación que concuerda con Murphy et al (188) donde señalan que no siempre es posible

cuantificar la cantidad de ARNm obtenido de  $1 \times 10^6$  células. Por su parte Thiagarajan et al (189) al comparar diferentes concentraciones de linfocitos mencionan que  $1 \times 10^7$  proporciona mejores resultados, lo cual coincide con nuestro estudio (139).

Dado que existían publicaciones donde la activación de linfocitos de otras especies se realizaba a diferentes concentraciones de Con-A (189, 190, 191), en este estudio se probaron tres diferentes concentraciones (5, 10 y 30  $\mu\text{g}$ ) obteniendo mejores resultados al usar 10  $\mu\text{g}$  de Con-A para diferenciar los niveles de ARNm para IL-2 entre los linfocitos activados y los controles (linfocitos sin activar) (139), lo cual coincide con otros investigadores (190, 191, 192, 193).

Otro parámetro estandarizado fue el tiempo de activación que producía mejores resultados en cuanto a la expresión del ARNm del fragmento amplificado del gen de la IL-2, con respecto a ello se evaluaron tres diferentes tiempos: 5, 24 y 48 h. En este estudio, al igual que en el experimento de Sundick y Gill (190), el ARNm de la IL-2 de pollo fue detectado desde las 5 h, sin embargo éste se manifestó en forma débil. Los mejores resultados se obtuvieron en los linfocitos activados durante 24 h, lo cual coincide con otras publicaciones (189, 192, 194).

En cuanto a la cinética de expresión obtenida a los días 0, 1, 4 y 10, un suceso remarcable es que en los linfocitos de pollos inyectados con la vacuna contra IA adicionada con la proteína N del virus de la rabia, se observó que la expresión del ARNm fue menor a la detectada en los linfocitos de los animales inmunizados con la vacuna experimental sola y por la comercial, incluso al primer día la expresión fue similar al grupo testigo (animales no vacunados). Si bien a los días 4 y 10 presentó una mayor expresión, este comportamiento podría ser un factor relacionado con la inducción de anticuerpos séricos detectados al día 14 pv, ya que esta bien documentado el papel de la IL-2 para actuar como un factor de

crecimiento y por lo tanto como un estímulo para la producción de anticuerpos, así como para estimular una respuesta de las células T citóxicas (11, 194).

A través del desarrollo de este proyecto se encontraron algunas discrepancias con otros autores, Bernstein et al (195) mencionan que son pocos los estudios que caracterizan la respuesta inmune celular y la humoral en el mismo trabajo, evitando valorar las relaciones entre ambas; sin embargo pensamos que estos contrastes pueden explicarse debido a la acción de otras moléculas integrantes del sistema inmune, como las células NK (natural killers), las CTL y otras interleucinas, o bien a las diferencias existentes entre el sistema inmune de los mamíferos y el de los pollos. A diferencia de los mamíferos, en la especie aviar no hay evidencia del paradigma Th1-Th2, ni de un equivalente directo de los eosinófilos, no hay evidencia para IgE y el equivalente a las IgG's, las IgY no tienen diferentes subclases (176).

El efecto inmunomodulador de la proteína N ha sido observado previamente, y este evento se ha relacionado con las características de SAg que presenta la proteína N, cuyo efecto ha sido explicado por la estimulación inespecífica de las cadenas  $\sqrt{\beta}8$  (humano) y  $\sqrt{\beta}6$  (ratones) del receptor de linfocitos T (TCR). Sin embargo, en este reporte no se apreció una respuesta de anticuerpos tangible como ha ocurrido en otra especies, sino hasta después del desafío, probablemente a diferencia de otras especies, en pollos la respuesta celular sea la principal implicada, debido al incremento de la proliferación celular. Asimismo, el hecho de que las propiedades de la proteína N hayan podido ser observadas en pollos y no solamente en mamíferos como ya había sido reportado (humano, ratón y mono), sugiere que la acción de este superantígeno es un efecto de amplio espectro. Sin embargo se deberán realizar más estudios acerca de su aplicación práctica, pues para usarlo de manera comercial tal vez no resulte muy útil, aunque

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

a nivel experimental aún podrían resolverse muchas interrogantes que se generaron durante el desarrollo de esta tesis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

- I. La proteína N del virus de la rabia, obtenida de diferentes fuentes puede ser utilizada como inmunomodulador en aves.
  
- II. En general, la respuesta inmune humoral, celular y protectora fue dosis dependiente, y se presentó al usar 20  $\mu$ g de proteína N.
  
- III. La expresión de la IL-2 en pollos vacunados contra IA adicionada con 20  $\mu$ g de N-Bac es menor a la que se presenta con la vacuna de IA experimental y la comercial, lo cual es una evidencia de que la proteína N del virus de la rabia es un mitógeno débil que tal vez genera una respuesta diferente, pues la protección conferida por la vacuna que la contuvo aumento en comparación con la vacuna experimental.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **PERSPECTIVAS.**

- a) Antes de utilizar la proteína N como inmunomodulador de manera comercial, se recomienda estudiar su respuesta en comparación con otros adyuvantes de diferentes orígenes.
  
- b) Probar el efecto de la proteína N adicionado a vacunas de influenza aviar en pollos de diferentes edades, para ratificar si la edad de los animales fue un factor determinante en los resultados obtenidos en este estudio.
  
- c) Clonar y expresar el gen N del virus de la rabia en un sistema bacteriano, lo cual resultaría más económico y sencillo que el sistema de expresión en baculovirus, o que la obtenida de cultivos celulares infectados.
  
- d) Estandarizar la prueba de RT/PCR para otras de las interleucinas que ya están secuenciadas y vislumbrar una perspectiva más amplia sobre el efecto que el SAg de rabia ejerce en el sistema inmune de los pollos, o bien esclarecer mecanismos de protección conferidos por otras vacunas en esta especie

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## LITERATURA CITADA

1. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human diseases. *Vaccine* 2001;19:2666-2672.
2. Cox JC, Coulter AR. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997;15:248-256.
3. Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002; 20:S7-S12.
4. Vogel FR. Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. *Ann NY Acad Sci* 1995;754:153-160.
5. Shi Y, Sheng W, Rock KL. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Sci-USA* 2000;97:14590-14595.
6. Masih KN. Immunomodulators in infectious diseases. *Int J Immunopharmacol* 2000;22:1083-1091.
7. Kamstrup S, San Martin R, Doberti A, Grande H, Dalsgaard K. Preparation and characterisation of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. *Vaccine* 2000;18:2244-2249.
8. Katz JM, Lu X, Todd CW, Newman MJ. A nonionic block co-polymer adjuvant (CRL1005) enhances the immunogenicity and protective efficacy of inactivated influenza vaccine in young and aged mice. *Vaccine* 2000;18:2177-2187.
9. Banda RVM., Loza-Rubio E., Mejía SP. 1991. Eficiencia del hidróxido de aluminio, vitaminas liposolubles y levamisol, empleados en a una bacterina

de leptospira en vaquillas, para la generación de anticuerpos específicos.  
Tec Pecu Méx 29:139-143.

10. Confer AW., Hall SM., Espe BH. 1985. Transient enhancement of the serum antibody response to *Brucella abortus* strain 19 in cattle treated with levamisol. Am J Vet Res 46:2440-2445.
11. Lowenthal JW, O'Neil TE, Strom DG, Andrew ME. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. Vet Immunol Immunopathol 1999;72:183-188.
12. Abbas AK, Lichtan AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3d ed. Pennsylvania USA:WB Saunders Company, 1997.
13. Sin JI., Kim JJ., Ugen KE., Cicarelli RB., Higgins TJ., Weiner DB. Enhancement of protective humoral (Th2) and cell-mediated (Th1) immune responses against herpes simplex virus-2 through co-delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression cassettes. Eur J Immunol 1998;28:3530.
14. Lewis PJ., Cox GJ, van Drunen Little-van den Hurk S., Babiuk LA. Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. Vaccine 1999;17:490-496.
15. Xiang Z., Ertl HC. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral-antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. Immunity 1995;2:129-135.
16. Kusakabe K., Xin KQ., Katoh H., Sumino K., Hagiwara E., Kawamoto S., Okuda K., Miyagi Y., Aoki I., Nishioka K., Klinman D. The timing of GM-CSF

- expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol* 2000;164:3102-311.
17. Schijns VEJC. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Op Immunol* 2000;12:456-453.
18. Scheerlinck JPY. Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19:2647-2656.
19. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 2002;168:1659-1663.
20. Astoul E, Lafage M, Lafon M. Rabies superantigen as an  $V\beta$  T-dependent adjuvant. *J Exp Med* 1996;183:1623-1631.
21. Loza-Rubio E., De Paz VO., Alvarado IA., Guzmán RC., Banda RVM., Salmerón SF. Obtención de una proteína recombinante del virus de la rabia empleada como inmunomodulador, en una vacuna experimental de parainfluenza-3 bovina. Reunión Anual de Investigación Científica. Tuxtla Gutiérrez , Chiapas. 2001.
22. Lafon M. Viral superantigens. *Rev Med Int* 2000;21:713-716.
23. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The Vb-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B stimulation of mature cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 1989;56:27.
24. Khan IA, Matsura T, Kasper LH. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite. Immunol* 1995;4:185-195.

25. Walsh P, Norris DA, Abe J, Martin DK, Giorno R, Leung DY. *Candida albicans* induces selective expansion of human T lymphocytes expressing the T cell receptor variables region V beta 5.1. *J. Dermatol. Sci* 1989;12: 140-146.
26. Krakauer T. Immune response to staphylococcal superantigens. *Immunol Res* 1999;20:163-173.
27. Mac Donald HR, Schneider R, Less RK, Howe RC, Acha-Orbea H, Festenstein H, Zinkernagel RM, Hengartner H. T cell receptor V $\beta$  use predicts reactivity and tolerance of Mls encoded antigens. *Nature* 1998;332:40-45.
28. Johnson HM, Torres BA, Soos JM. Superantigens: structure and relevance to human disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;212:99-109.
29. Papageorgiou AC, Acharya KR. Superantigens as immunomodulators; recent structural insights. *Structure* 1997;5:991-996.
30. Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol* 2000;8:369-375.
31. Petersson K, Hakansson M, Nilsson H, Forsberg G, Svensson LA, Liljas A, Walse B. Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence. *EMBO J* 2001;20:3306-3312.
32. Maillard I, Luthi F, Acha-Orbea H, Diggelman H. Role of the immune response induced by superantigens in the pathogenesis of microbial infections. *Parasitol* 1997;115:S67-S78.
33. Fields BA, Malchioldi EL, Li H, Ysern X, Stauffacher CV, Schlievert PM, Karjalainen K, Mariuzza RA. Crystal structure of a T cell receptor beta chain complexed with a superantigen. *Nature* 1996;384:188-192.

34. Stukowski N, Palkama T, Ciurli C, Sekaly RP, Thorley-Lawson DA, Huber BT. An Epstein-Barr virus associated superantigen. *J Exp Med* 1996;184: 971-979.
35. Yao Z, Maraskovski E, Spriggs MK, Cohen JL, Armitage RJ, Alderson MR. Herpesvirus saimiri open reading frame 14, a protein encoded by a T lymphotropic herpesvirus, binds to MHC class II molecules and stimulates T cell proliferation. *J Immunol* 1996;156:3260-3266.
36. Doyon L, Simard C, Sekaly RP, Jolicoeur P. Evidence that the murine AIDS defective virus does not encode a superantigen. *J Virol* 1996;70:1-9.
37. Robinson M, Gustad TR, Storey N, David CS. Heligmoide polygyrus adult worm homogenate superantigen: presentation to T cells requires MHC class I positive accessory cells. *Cell Immunol* 1995;161:188-189.
38. Huang W, Koller LD. Superantigen activation and kinetics of cytokines in the Long-Evans rat. *Immunol* 1998;95:331-338.
39. Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol Rev* 1999;168:257-269.
40. Votjov N, Ross HF, Novick RP. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10102-10107.
41. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Scarpelino L, et al. Clonal deletion of V $\beta$ 14 bearing T-cells in mice transgenic for mammary tumour virus. *Nature* 1991;350:207-211.
42. Dyson PJ, Knight AM, Fairchild S et al. Genes encoding ligands for deletion of VB 11 T cells cosegregate with mammary tumour virus genomes. *Nature* 1991;349:531-532.

43. Golovkina T, Agafonova Y, Kazansky D, Chernovsky A. Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *J Immunol* 2001;166:2244-2250.
44. Schiffenbauer J, Soos J, Johnson H. The possible role of bacterial superantigens in pathogenesis of autoimmune disorders. *Immunol Today* 1998; 19:117:120..
45. Marrack P, Kapler JW. The staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J Ex Med* 1990;171:455-464.
46. Peavy DL, Adley WH, Smith TH. The mitogen effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. *J Immunol* 1970;105:1453-1460.
47. Kappler JB, Koltzin L, Herron EW, Gelfald RD, Bigler Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P. V $\beta$  specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989;15:161-163.
48. Isono T, Isegawa Y, Seto A. Analysis of T cell receptor V $\beta$  expression in rabbit T lymphocytes induced to proliferate by an HTLV transformed leukemogenic T cell line. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122: 458-469.
49. Yarwood JM, Leung DY, Schlievert PM. Evidence for the involvement of bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis and Kawasaki syndrome. *FEMS Microbiol Lett* 2000;192:1-7.
50. Fleisher B. Too many superantigens. In: Bacterial superantigens. Thibodeau J and Sekaly RP (eds). *Springer Verlag*, 1995. pp. 25-33.
51. Timoney JF, Mukhtar MM. The protective M proteins of the equine group C streptococci. *Vet. Microbiol* 1993; 37: 389-395.
52. Kotzin BL, Leung DY, Kappler J, Marrack P. Superantigens and their potential role in human diseases. *Adv Immunol* 1993;54:99-110.

53. Carnoy C, Floquet S, Marceau M, Sebbane F, Haentjens-Herwegh S, Devalckenaere A, Simonet M. The superantigen gene *ypm* is located in an unstable chromosomal locus of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 2002;184:4489-4499.
54. Kaemfer R, Arad G, Levy R, Hillman D. Defense against biologic warfare with superantigens toxins. *Isr Med Assoc J* 2002;4:520-523.
55. Kapler JB, Koltzin L, Herron EW, Gelfand RD, Bigler Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choi Y, Marrack P.  $V\beta$  specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989;15:161-163.
56. Karapetian O, Shakhov AN, Kraehenbuhl JP, Acha-Orbea H. Retroviral infection of neonatal Peyer's patch lymphocytes through an intact epithelium. *J Exp Med* 1994;180:1511-1516.
57. Huber BT, Hsu PN, Sutkowski N. Virus encoded superantigens. *Microbiol. Rev* 1996;60:473-482.
58. Korman AJ, Bougaret P, Meo T, Rieckhof CE. The mouse mammary tumor virus long terminal repeat encodes a type II transmembrane glycoprotein. *EMBO* 1992;11:1901-1911.
59. Bille WS, Koenig S, Wehrli N, Miconnet I, Levy F, Diggelmann H, Acha-Orbea H. Testing mouse mammary tumor virus superantigen as adjuvant in cytotoxic T-lymphocyte responses against a melanoma tumor antigen. *Int J Cancer* 2002;99:201-206.
60. Dobrescu D, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN. Enhanced HIV replication in  $V\beta$  12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 1995;82:753-760.
61. Auwaerter PG, Hussey GD, Goddard EA, Hughes J, Ryon JJ, Strebet PM, Beatty D, Griffin DE. Changes within T cell receptor  $V\beta$  subsets in infants

- following measles vaccination. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;79:163-178.
62. Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puoti M, Primi D. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V $\beta$  sequences. *Science* 1991;254:860-862
63. Torres BA, Tanabe T, Subramaniam PS, Yamamoto JK, Johnson HM. Mechanism of HIV patogénesis: role of superantigens in disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:188S-192S.
64. Wagner RR, Rose JK. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: Fields DM editor. *Fundamental Virology* 3<sup>rd</sup>, Philadelphia, USA: Raven Publishers; 1996: 1121-1135.
65. Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, Smith CL. The molecular biology of rabies virus. *J Virol* 1988;50:691-697.
66. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (eds). *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, USA: Springer Verlag; 1995:275-288.
67. Shope RE. Rabies virus antigenic relationship. In: Baer GM editor. *The Natural History of Rabies*. Boca Raton, USA: CRC Press; 1991:141-156.
68. Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ, Koprowski H. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev Infect Dis* 1988;10:S785-S798.
69. King A, Crick J. Rabies related viruses. In: Campbell JB, Charlton KM editors. *Rabies*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers. 1988:177-200.



70. Rupprecht CE, Dietzschold B, Wunner WH, Koprowski H. Antigenic relationships of Lyssaviruses. In: Baer GM editor. *The Natural History of Rabies*. Boca Raton, USA: CRC Press; 1991:69-100.
71. Loza Rubio E, Pedroza RR, Montaña-Hirose JA, Aguilar SA. Caracterización con anticuerpos monoclonales de virus de la rabia aislados de fauna doméstica y silvestre de México. *Vet Méx* 1998;29:345-350.
72. Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 1993;194:70-81.
73. Tordo N, Bourhy H, Sacramento D. PCR technology for Lyssavirus Diagnosis. In: Clewley JP editor. *The polymerase chain reaction for human diagnosis*. London, UK: CRC Press;1995:125-145.
74. Fraser CF, Hooper PT, Lunt RA, Gould AR, Gleason LJ, Hyatt AD, Russell GM, Kattenbelt JA. Encephalitis caused by a lyssavirus in fruit bats in Australia. *Emerging Infect Dis* 1996;2:327-331.
75. Tsiang H. Pathophysiology of rabies virus infection of the nervous system. *Adv. in Virus Res* 1993; 42: 375-412.
76. Madore HP, England JM. Rabies virus protein synthesis infected BHK-21 cells. *J Virol* 1977;22:102-112.
77. Tordo N, Poch O. Primary structure of rabies virus. In: Campbell JB, Charlton KM editors. *Rabies*. Boston, USA: Kluwer Ac. Publishers;1988:25-45.
78. Tordo N, Koutznetzov A. The rabies virus genome: an overview. Ondersterpoort J. *Vet* 1993;60: 263-269.
79. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G. Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: Segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res* 1986a;14:2671-2683.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

80. Tordo N, Poch O, Ermine A, Keith G, Rugeon F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene?. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1986b; 83:3914-3918.
81. Conzelman KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel H. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 1990;175:485-499.
82. Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J Gen Virol* 1994;75:2889-2896.
83. Minamoto N, Tanaka H, Hishida M, Goto H, Ito H, Naruse S, Yamamoto K, Sugiyama M, Kinjo T, Mannen K, Mifune K. Linear and conformational dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus. *Microbiol. Immunol* 1994;38:449-455.
84. Lafon M, Wiktor TJ. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non structural protein. *J Gen Virol* 1985;66:2125-2133.
85. Wiktor TJ, Clark HF. Comparison of rabies virus strains by means of the plaque reduction test. *Ann Microbiol* 1973;124A:283-287.
86. Montaño HJA. Efficacité du traitement antirrabique: Extension au Lyssavirus de la chauve-souris europeene (EBL) et role de l'immunosuppression. [Thèse de doctorat]. Paris:Université Paris VI. 1992.
87. Lafon M, Lafage M. Antiviral activity of monoclonal antibodies specific for the internal proteins N and NS of rabies virus. *J Gen Virol* 1987;68:311-313.
88. Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt LC. Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *J Virol* 1993;65:6080-6086.

89. Herzog M, Lafage M, Montaño-Hirose JA, Fritzell C, Scott-Algara D, Lafon M. Nucleocapsid specific T and B cells responses in humans after rabies vaccination. *Virus Res* 1992;24:77-89.
90. Lodmell DL, Sumner JW, Esposito JJ, Bellini WJ, Ewalt LC. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *J Virol* 1991;65:3400-3405.
91. Celis E, Ou D, Dietzschold B, Koprowski H. Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol* 1998;62:3128-3135.
92. Tollis M, Dietzschold B, Buona VC, Koprowski H. Immunization of monkeys with rabies nucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine* 1991;9:134-136.
93. Takita-Sonoda Y, Fuji H, Mifune K, Ito Y, Hivage M, Nizhizono A, Mannen K, Minamoto N. Resistance of mice vaccinated with rabies virus internal structural proteins to lethal infection. *Arch Virol* 1993;132: 51-65.
94. Drings A, Jallet C, Chambert B, Tordo N, Perrin P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine?. *Vaccine* 1999;17:1549-1557.
95. Astoul E. Influence d'un superantigène atypique, le superantigène de la rage, sur l'induction d'une reponse immune spécihique. [Thèse de doctorat]. Paris. Université Paris VII. 1996.
96. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez F, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, Scott-Algara. Evidence in humans of a viral superantigen. *Nature* 1992;358:507-510.
97. Martínez-Arends A, Astoul E, Lafage M, Lafon M. Activation of human tonsil lymphocytes by rabies virus nucleocapsid superantigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:177-184.

98. Ijichi S, Yamano Y, Osame M, Hall W. A kinetic comparative study of lymphocyte responses to SAg and PHA: reciprocal presentation of SAg on the surface of activated lymphocytes. *Cell. Immunol* 1996;173:312-316.
99. Lafon M, Scott-Algara D, Marche PN, Cazenave PA, Jouvin Marche. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994;180:1207-1214.
100. Simpson VR. Wild Animals as reservoirs of infectious diseases in the UK. *The Vet J* 2002;163:128-146.
101. Halvorson DA, Karunakaran D, Senne C, Zeleher C, Bailey A, Abraham A, Hinshaw V, Newman J. Epizootiology of avian influenza-simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis* 1983; 27:77-85.
102. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 2000;74:3-13.
103. Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol* 2000;29:353-360.
104. Leigh-Perkins L., Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenicity avian influenza virus for emus, geese, ducks and pigeons. *Avian Dis* 2002;46:53-63.
105. Swayne DE. Pathobiology of H5N2 mexican avian influenza virus infections of chickens. *Vet Pathol* 1997;34:557-567.
106. Lamb RA, Krug RM. Orthomixoviridae.: the viruses and their replication. In: Fields BN., Knipe DM., Howley PM editors. *Fields Virology*, 3th ed. Phi, USA:Lippincott-Raven Publishers;.,1996:1353-1395.
107. Crawford JM, Garcia M, Stone H, Swayne D, Slemons R, Perdue ML. Molecular characterization of the hemagglutinin gene and oral

- immunization with waterfowl-origin avian influenza virus. *Avian Dis* 1998;42:486-496.
108. Capua I, Mutinelli F, Pozza MD, Donatelli I, Puzelli S, Cancellotti FM. The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications. *Acta Trop* 2002;83:7-11.
  109. Capua I, Mutinelli F, Maragnon S, Alexander DJ. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 2000;29:537-543.
  110. Panigrahy B, Senne DA, Pedersen JC. Avian influenza virus subtypes incide and outside the live bird markets, 1993-2000: A spatial and temporal relationship. *Avian Dis* 2002;46:298-307.
  111. Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, Deeks J. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine* 2000;18:957-1030.
  112. Villarreal CL, Flores HAO. The Mexican avian influenza (H5N2) outbreak. 4<sup>th</sup> Internat. Symp on Avian Influenza. Atlanta, Ga. 1997:18.
  113. Webster RG, Taylor J, Pearson J, Rivera E, Paoletti E. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinant. *Avian Dis* 1996;40, 461-465.
  114. Neem K, Hussain M. An outbreak of avian influenza in poultry in Pakistan. *Vet Rec* 1995;21:137:439.
  115. Shortridge KF. Poultry and the influenza H5N1 outbreaks in Hong Kong, 1997: abridged chronology and virus isolation. *Vaccine* 1999;17(S1):S26-S29
  116. Heui Seo H, Webster R. Cross-reactive, cell-medited immunity protection of chickens from H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets. *J Virol* 2001;75:2516-2525.

117. Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW. Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. *Avian Dis* 2001;45:355-365.
118. Zanella A, Dall'Ara P, Martino PA. Avian influenza epidemic in Italy due to serovar H7N1. *Avian Dis* 2001;45:257-261.
119. Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine* 2000;18:1088-1095.
120. Bahl AK, Pomeroy BS. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccine in breeder turkeys. *JAVMA* 1977;171:1105.
121. Stone HD. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Dis* 1987;31:483-490.
122. Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, Webster R, Paoletti E. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine* 1988;6:504508.
123. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, Smith G, Garcia M, Stone H, Perdue ML. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 1999;17:2265-2274.
124. Randall DR, De Witt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 1997;15:71-78.
125. Webster RG, Taylor J, Pearson J, Rivera E, Paoletti E. Immunity to Mexican H5N2 avian influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinant. *Avian Dis* 1996; 40, 461-465.

126. Loza-Rubio E, Diosdado VF, Hernández MA., Banda RVM, Morilla GA, García GJ. Diagnóstico serológico de influenza aviar por medio de una técnica de microinmunodifusión (MIDG) en agar. *Téc Pecu Méx* 1997;35:165-169.
127. Kamata H, Onkobo S, Sugiyama M, Matsura Y, Kamata Y, Tsukiyama KK, Imaoka K, Kai C, Yoshikawa K, Yamanohuchi K. Expression in baculovirus vector system of the nucleocapsid protein gene of rinderpest virus. *J Virol Met* 1993;43:159-166.
128. Díaz AM. Suckling-mouse brain vaccine. In: Meslin FX, Kaplan M, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4<sup>th</sup> ed. Finland: WHO. 1996:243-250.
129. Barret T, Inglis SC. Purification and titration of influenza viruses. In: Mahy BWJ editor, *Virology, a practical approach*. Washington, USA: IRL Press. 1991:119-150.
130. Perrin P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: Meslin FX, Kaplan M, Koprowski H. editors. *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, Switzerland: WHO; 1996:433-457.
131. Sokol F. Purification of rabies virus and isolation of its components. In: Kaplan M, Koprowski H, ed. *Laboratory techniques in rabies*. 3d ed. Geneva, Switzerland. WHO;1973: 175.
132. Lowry D, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol chem* 1951;195:265-275.
133. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T. *Nature* 1970;227:680-685.
134. Westermeier R. *Electrophoresis in practice*. 3<sup>rd</sup> ed. Freiburg, Germany: VCH Verlag; 1997.

135. Alexander DJ, Allan WH. Avian influenza in turkeys: a survey of farms in eastern England 1979/1980. *Br Vet J* 1982;138:479-487.
136. Randall DR, De Witt CM, Donnelly JI, Liu MA, Ulmer JB. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 1997;15:71-78.
137. Bounous DI, Campagnoli RP, Brown J. Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes. *Avian Dis* 1992;36:1022-1027
138. Ansar AS, Gogal MR, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Met* 1994;170:211-224.
139. Loza-Rubio E., Esquivel GF, Mercado SJ, Gutiérrez XL, Banda RVM, Verdugo RA. Análisis de la expresión del ARNm de la IL-2 en bazo de pollos vacunados contra el virus de la influenza aviar. *Téc Pecu Méx* 2003;41 (en prensa).
140. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. San Francisco, USA: Mc Graw-Hill Inc: 1994.
141. Zanetti CR, Consales CA, Rodríguez-da-Silva AC, Toyoshima YK, Pereira OA. Short duration of neutralizing antibody titers after pre-exposure rabies vaccination with suckling mouse brain vaccine. *Braz J Med Biol Res* 1998a;31:1275-1280
142. Megid J, Peracoli MT, Curi PR, Zanetti CR, Cabrera WH, Vassao R, Ito FH. Effect of the bacillus of Calmette-Guérin, Propionobacterr acnes and avidine as immunomodulators in antirabies vaccination of mice using Fuenzalida-Palacios mouse brain vaccine. *Vaccine* 1999;17:2446-245.



143. Andrade MC, de Oliveira AN, Romijn PC, Kimura LM. Immune response produce by anti-rabies vaccines in marmosets (*Callithrix sp*). *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32:533-540.
144. Albas A, Nogueira RM, Fontolán OL, Albas KD, Bremer Neto H. Effect of freeezing on immunogenicity of the rabies vaccine produced in suckling mouse brain. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34:49-52.
145. De Paz VO., Alvarado IA., Montañó HJA, Loza-Rubio E. Efecto del virus de la rabia como inmunomodulador en una vacuna experimental de Parainfluenza-3 en hámsters. XXXV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Mérida, Yucatán. 1999:153.
146. Zanetti CR, Chaves LB, Silva AC, Lee LM, Pereira OA. Studies on human anti-rabies immunization in Brazil. I. Evaluation of the 3\*1 pre-exposure vaccination schedule under field conditions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37:349-352.
147. Zanetti CR, de Franco MT, Vassao RC, Pereira CA, Pereira OA. Failure of protection induced by a brazilian vaccine against Brazilian wild rabies viruses. *Arch Virol* 1998b;143:1745-1756.
148. Piza AS, Santos JL, Chaves LB, Zanetti CR. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain vaccine. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999;41:39-43.
149. Kouznetzoff A. Etude de l'interaction entre la protéine N de la souche PV du virus rabique et l'ARN viral *in vitro*. [Thèse de doctorat]. Paris. Université Paris 6; 1997.
150. Drings A. Vers un vaccin contre les Lyssavirus européens – une approche structurale et immunologique. [Thèse de doctorat]. Berlin. Université Libre de Berlin; 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

151. Smith BJ. Quantification of proteins on Polyacrylamide gels (nonradioactive). In: Walker JM editor. *Methods in Molecular Biology Vol 1 Proteins*. New Jersey, USA: Humana Press; 1998:647.
152. Préhaud C., Harris RD., Fulop V., Lek Koh C., Wong J., Flamand A. Expression, characterization and purification of a phosphorylated rabies nucleoprotein synthesized in insect cells by baculovirus vector. *Virology* 1990;178:486-497.
153. Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, Wunner WH, Ertl HCJ, Koprowski H. Rabies virus nucleoprotein expressed in a purified form from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88: 2001-2005.
154. Mahan SM., Kumbula D., Burrige MJ., Barbet AF. The inactivated Cowdria ruminantium vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine* 1998;16:1203-1211.
155. Brugh MC, Beard W, Stone HD. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. *Amer J Vet Res* 1979;40:165-169.
156. Stone HD. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Dis* 1987;31:483-490.
157. Reynolds DL, Maraqa AD. Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. *Avian Dis*. 2000;44:145-154.
158. García GJ, Hernández MA, Rodríguez VH. Factores de patogenicidad e inmunización contra Influenza Aviar. XX Convención Anual ANECA. Acapulco, Guerrero. 1995:397-404.
159. Hernández MA, Rodríguez VH, Rivera CE, García GJ. Evaluación de una vacuna comercial emulsionada ante el desafío de una cepa altamente virulenta de Influenza Aviar (H5N2). *Vet Méx* 1995;26 Supl 2: 104.

160. Hernández MA, Cerón HM, Rodríguez VH, García GJ. Protección por cuatro vacunas de Influenza aviar (H5N2) en codornices (*Coturnix coturnix japonica*). XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45th Western Poultry. Can Cún, Quintana Roo. 1996:296-298.
161. Swayne DE, Beck JR, Garcia M, Stone HD. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathol* 1999;28:245-255.
162. Powers DC., Belshe RB. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 1993;167:584-592.
163. Pagès-Manté A, Saubi N, Artigas C, España E. Experimental evaluation of an inactivated vaccine against chicken anemia virus. *Avian Pathol* 1997;26: 721-729.
164. McElhaney JE, Upshaw CM, Hooton JW, Lechelt KE, Meneilly GS. Responses to influenza vaccination in different T cell subsets: a comparison of healthy young and older adults. *Vaccine* 1998;16:1742-1747.
165. Webster RG. Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine* 2000;18:1686-1689.
166. Mata VAE. Efecto de la infección del virus de la rabia e inoculación de nucleocápside sobre el crecimiento de ratones de las líneas BALB/C, C3H y C57 BL/6. [Tesis de maestría]. México D, F: Universidad Nacional Autónoma de México.; 1998.
167. Rodríguez VH, Beltrán RJ, Socci EG, Hernández MA, Diosdado VF, García GJ. Estudio comparativo de la vacunación contra influenza aviar en pollo de engorda al día y a los ocho días de edad. XXI Convención Anual de la

- Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 45th Western poultry disease conference. Cancún Quintana Roo. 1996:367-369.
168. Loza-Rubio E, Molina GJ, Montaña HJA, Verdugo RA. The rabies virus N protein, as an adjuvant in an inactivated influenza vaccine. *Can J Vet Res*, 2002 (enviado).
  169. Norma Oficial Mexicana. NOM-EM-016-ZOO. Campaña Nacional contra la Influenza Aviar. 2002.
  170. Russell SM, Liew FY. T cells primed by influenza virion internal components can cooperate in the antibody response to the hemagglutinin. *Nature* 1979;280:147-148.
  171. Scherle PA, Gerhard W. Differential ability of B cells specific for external vs. internal influenza virus proteins to respond to help from influenza virus-specific T-cell clones in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4446-4450.
  172. Esquivel FR Lopez S, Gutierrez XL, Arias C. The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Arch Virol* 2000;145:813-825.
  173. Dhinakar RG, Jones RC. Cross reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis virus vaccine. *Avian Pathol* 1997;26:641-649
  174. Wagner U, Burkhardt, E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70,151-159.
  175. Miyamoto T, Min W, Lillehoj HS. Lymphocyte proliferation response during *Eimeria tenella* infection assessed by a new, reliable, nonradioactive colorimetric assay. *Avian Dis* 2002;46:10-16.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

176. Rothwell L., Hamblin A., Kaiser P. 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol* 83: 149-160.
177. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Hamada S. Administration of superantigens protects mice from lethal *Listeria monocytogenes* infection by enhancing cytotoxic cells. *Infect Immun* 2001;69:6633-6642.
178. Gampfer J, Thon V, Gulle H, Wolf HM, Eibl MM. Double mutant and formaldehyde inactivated TSST-1 as vaccine candidates for TSST-1 induced toxic shock syndrome. *Vaccine* 2002;20:1354-1364.
179. Hausmann S, Wucherpfennig KW. Activation of autorreactive T cells by peptides from human pathogens. *Curr Op Immunol* 1997; 9:831-838.
180. Seckellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis. *J Interferon Res* 1994;14:71-79.
181. Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon- $\gamma$  gene. *J Interf Cyt Res* 1995;15:939-945.
182. Sterneck E, Blattner C, Graf T, Leutz A. Structure of the chicken myelomonocytic growth factor gene and specific activation of its promoter in avian myelomonocytic cells by protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992;12:1728-1735.
183. Jakowlew SB, Cubert J, Danielpour D, Sporn MB, Roberts AB. Differential regulation of the expression of transforming growth factor- $\beta$  mRNAs by growth factors and retinoic acid in chicken embryo chondrocytes, myocytes and fibroblasts. *J of Cell Physiol* 1992;150:377-385.
184. Weining KC, Sick S, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homologue of mammalian interleukin-1 $\beta$ :cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* 1998;258:994.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

185. Kaiser P, Wain HM, Rothwell L. Structure of the chicken interferon- $\gamma$  gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene* 1998;207:25-32.
186. Kaiser P, Mariani P. Promotor sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T cell proliferative activity is IL2 and not IL15. *Immunogenetics* 1999;49:26-35.
187. Rothwell L, Hamblin A, Kaiser P. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;83: 149-160.
188. Murphy E, HienyS, SherA, O'Garra A. Detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. *J Immunol Meth* 1993;162:211-223.
189. Thiagarajan D, Ram GC, Bansal MP. Optimum conditions for in vitro chicken IL-2 production and its in vivo role in Newcastle disease vaccinated chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;67:79-91.
190. Sundick RS, Gill-Dixon. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immunol* 1997;159:720-725.
191. Rottman JB, Freeman EB, Tonkonogy S, Tomkins MB. A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:1-18.
192. Giguère S, Prescott JF. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;7:1-15.
193. Leutenegger CM, Mislin CN, Sigrist B, Ehrenguber MU, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Quantitative real time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71: 291-305.
194. Lillehoj HS, Min W, Choi KD, Babu SU, Burnside J, Miyamoto T, Rosenthal BM, Lillehoj EP. Molecular, cellular, and functional characterization of

chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;82:229-244.

195. Bernstein E, Gardner EM, Abrutyn E, Gross P, Murasko DM. Cytokine production after influenza vaccination in a healthy elderly population. *Vaccine* 1998;16: 1722-1731.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN