

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

Y ZOOTECNIA

IL2 E IFN $\gamma$ : DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE RT-PCR EN POLLOS ESTIMULADOS CON FACTOR DE  
TRANSFERENCIA ESPECÍFICO PARA INFLUENZA AVIAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ANTONIO ALBERTO BRAVO BLAS**

ASESORAS

DRA. LAURA COBOS MARÍN

MPA. FRIDA SALMERÓN SOSA

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL  
PROYECTO PAPIIT IN226005

*Para Amelia Correa y Donaciano Fabián.*

*Donde sea que estén*

## **Agradecimiento**

**Y alguna vez juré que este apartado sería el más breve...**

A mis padres por haber hecho su mejor esfuerzo en apoyarme.

A toda la gente del DMEI con la que conviví durante casi dos años. En especial a la gente del laboratorio de Virología y Serología. Aprendí muchísimo de todos.

A los miembros de mi jurado.

A Frida Salmerón, por el tiempo dedicado, por ser tan accesible y tan amable.

A Laura Cobos y Ricardo Cuetos. Porque para mi son el ejemplo más preciso de la palabra mentor. Además soy su fan.

A Iris Estrada García, de la ENCB, IPN. Por su valiosísima cooperación.

A Karla por el apoyo, por el tiempo y nuevamente por el apoyo.

A Rodrigo Téllez Núñez por la gran colaboración con este trabajo y como compañero de laboratorio.

A mis queridos amigos de la FMVZ: Julio, Claus, Gabriel, Zaira, Rodrigo Kanafany, Carinthia, Juan Carlos (Gin), Maru, Gerardo, Rossana, Fabiola, Fany y Javier. Gracias por haber compartido de todo conmigo. Los amo.

Y por último, a mi muy amada Universidad. No se qué sería de mí sin ella.

*“Vas a cosechar lo que sembraste”*

*Lou Reed.*

## CONTENIDO

	Página
Dedicatoria.....	III
Agradecimiento.....	IV
Contenido.....	V
Lista de abreviaturas.....	VII
Resumen.....	1
Introducción.....	2
¿Qué es la influenza aviar?.....	3
<i>Diseminación</i> .....	5
<i>Signos y métodos diagnósticos</i> .....	5
<i>Perspectiva actual en la vacunación</i> .....	6
<i>Impacto económico de IA</i> .....	7
Factor de Transferencia (FT).....	7
Reacción a los antígenos.....	8
<i>Bazo</i> .....	8
<i>Estructuras: pulpa blanca y pulpa roja</i> .....	10
Linfocitos.....	10
<i>Linfocitos T citotóxicos (LTc)</i> .....	12

<i>Linfocitos T cooperadores (LTh)</i> .....	12
<b>Citocinas</b> .....	13
<i>Interleucina 2 (IL 2)</i> .....	14
<i>Interferón gamma (IFN ?)</i> .....	15
<b>PCR y RT-PCR</b> .....	16
<b>Electroforesis</b> .....	18
<b>Objetivo</b> .....	19
<b>Justificación</b> .....	19
<b>Hipótesis</b> .....	19
<b>Material y métodos</b> .....	20
<i>Obtención del FTAe</i> .....	20
<i>Tratamiento con FTAe</i> .....	20
<i>Obtención de bazo</i> .....	21
<i>Obtención de RNA y RT-PCR:</i> .....	22
<i>Determinación de la expresión de citocinas</i> .....	23
<b>Análisis de resultados</b> .....	27
<b>Resultados</b> .....	27
<b>Discusión</b> .....	29
<b>Conclusión</b> .....	32
<b>Referencias</b> .....	3

## **Lista de abreviaturas**

FMVZ. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México.

NOM. Norma Oficial Mexicana.

LTc. Linfocitos T citotóxicos.

NK. Asesina Natural.

FT. Factor de Transferencia.

FTAe. Factor de Transferencia específico para Influenza Aviar.

Kda. Kilodaltons.

IA. Influenza Aviar.

H. Hemoaglutinina.

N. Neuraminidasa.

RNA. Ácido Ribonucleico.

PRONABIVE. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios

USD. Dólares norteamericanos.

TCR. Receptor de Linfocitos T.

BCR. Receptor de Linfocitos B.

CD. Conjunto de Diferenciación.

LTh. Linfocitos T Cooperadores.

MHC. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

IL2. Interleucina 2.

IFN $\gamma$ . Interferón Gamma.

DNA. Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc. Copia de Ácido Desoxirribonucleico.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RT-PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa- Transcriptasa Inversa.

SC. Subcutáneo.

IM. Intramuscular.

h. Horas.

L. Luz

O. Oscuridad.

s. Segundos.

U. Unidad.

SSF. Solución Salina Fisiológica.

MMLV-RT. Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase.

dT. Deoxyribise Thymidine.

μL. Microlitro

mL. Mililitro.

rpm. Revoluciones Por Minuto.

DEPC. Di Etil Piro Carbonato.

MR. Mezcla de Reacción.

pb. Pares de bases.

BCA. Ácido Bisinconínico.

**Resumen.**

BRAVO BLAS ANTONIO ALBERTO. IL2 E IFN?: DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR EN POLLOS ESTIMULADOS CON FACTOR DE TRANSFERENCIA ESPECÍFICO PARA INFLUENZA AVIAR (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. LAURA COBOS MARÍN Y MPA. FRIDA SALMERÓN SOSA).

Se realizó un estudio preeliminar para determinar la expresión de dos citocinas: IL2 e IFN?. Este estudio se hizo en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. El experimento se llevó a cabo con 52 pollos sanos que se dividieron en cuatro grupos. Se inocularon con tres diferentes dosis de FTAE y un testigo (0.1, 1, 10 dosis y SSF). Posteriormente se les extrajo el bazo en cuatro diferentes tiempos (0, 4, 7 y 10 días). A todas las muestras se les hizo RT-PCR para comprobar la presencia o ausencia del RNAm de ambas citocinas. El objetivo de este trabajo fue demostrar que el FTAE es capaz de mejorar la respuesta inmune celular mediante la inducción de la producción de IL2 e IFN?. Los resultados demuestran que el FTAE indujo la expresión de IL2 en el grupo de pollos que recibió 1 dosis ( $P < 0.05$ ). Los diferentes tiempos a los que se obtuvieron las muestras no tuvieron correlación con la expresión del RNAm de las muestras, ni fueron significativos. Conclusión: 1 dosis de FTAE indujo la expresión de IL2 sin importar el tiempo de toma de muestras. Se recomienda la utilización de 1 dosis de FTAE para estudios futuros relacionados con este tema.

## Introducción

Durante los últimos años se han presentado varios brotes de influenza aviar (IA) en diferentes países alrededor del mundo<sup>1, 2, 3, 4</sup>. La influenza aviar es una enfermedad de alta importancia económica para la industria avícola, que puede manifestarse clínicamente ya sea afectando el tracto respiratorio, reproductivo o urinario, en el caso de las cepas de baja patogenicidad, o en caso de las cepas altamente patógenas, provocando un cuadro sistémico<sup>5</sup> y mortal.

En México la enfermedad se encuentra regulada por la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (NOM-044-ZOO-1995) y actualmente solo está presente el virus de baja patogenicidad H5N2<sup>6, 7</sup>. Para mantener el control de la enfermedad en nuestro país, se emplean vacunas inactivadas y una vacuna recombinante de viruela aviar que contiene el gen H5 del virus de influenza. Estas medidas, si bien reducen el cuadro clínico en caso de brote, no evitan la diseminación del virus, lo que genera una mayor probabilidad de que éste circule entre las parvadas y mute a sus formas de alta patogenicidad<sup>36</sup>. Debido a esto es recomendable el desarrollo de inmunomoduladores eficientes, eficaces y de fácil acceso para la industria avícola nacional, que permitan mejorar la respuesta a la infección y disminuyan la diseminación del virus.

En general la respuesta inmune es el resultado de interacciones entre el antígeno, células B, células T y células presentadoras del antígeno<sup>8</sup>. En los últimos 20 años ha quedado claro que la regulación de la respuesta inmune celular y otras funciones inmunes dependen de un

pequeño número de citocinas; una de ellas es la interleucina 2 (IL2), cuyo nombre fue adoptado a partir de 1979<sup>8</sup>.

Schauenstein y Kromer<sup>9</sup> han resumido los primeros trabajos referentes a las citocinas aviares, que de manera general, no difieren de las citocinas de mamíferos. IL2 tiene la función de aumentar la proliferación de linfocitos T citotóxicos (LTC) para eliminar células infectadas<sup>10</sup> por virus, así como mejorar la eficacia de los agentes inmunizantes<sup>11</sup>.

Además de la IL2 y su papel en la respuesta inmune celular, es bien sabido que el interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) puede inducir resistencia a las infecciones virales y ser importante para la activación de macrófagos y células NK.

### **¿Qué es Influenza Aviar?**

La influenza aviar (IA) es una enfermedad viral que es causada por el virus influenza tipo A, miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. Este virus ha sido asociado a enfermedad grave en aves, así como en humanos y algunos mamíferos como cerdos, caballos, focas o ballenas. Infecciones en aves confinadas y domésticas han sido asociadas con una variedad de síndromes que van desde enfermedades subclínicas y leves del tracto respiratorio hasta pérdida de la producción de huevo y enfermedad aguda, generalizada y fatal<sup>12</sup>.

La clasificación viral en tipos A, B o C se determina con base en los antígenos en su matriz o su nucleocápside, que son comunes en todos los virus del mismo tipo. Influenza tipo A, como miembro de la familia *Orthomyxoviridae* es un virus envuelto de tamaño medio (60-120 nm), con RNA de cadena sencilla y de sentido negativo<sup>13</sup>. Su genoma está compuesto por 8 segmentos de genes que codifican para 10 proteínas. La superficie viral tiene dos diferentes proyecciones de glicoproteínas: trímeros con forma de barras, que corresponden a la hemoaglutinina (H) y tetrámeros con forma de hongo correspondientes a la neuraminidasa (N)<sup>14, 15</sup>. Actualmente se conocen 16 subtipos de H (de H1 a H16)<sup>16</sup> y 9 de N (de N1 a N9)<sup>14</sup>. Para hacer una clasificación con base en la H y N, los virus se dividen en subtipos de acuerdo con la naturaleza antigénica de sus glicoproteínas. Para clasificar por completo un virus de influenza se incluye el tipo (A, B o C), el huésped de origen (a excepción de los humanos), origen geográfico, número de la cepa (si lo hay) y año de aislamiento, seguido de la descripción antigénica de su H y N entre paréntesis<sup>17</sup>. Por ejemplo, un virus tipo A aislado a partir de pollos en el estado de Querétaro en 1995 y clasificado como H5N2, se denomina A/Ck/Qro/14588-19/95 (H5N2).

Un componente responsable de la patogenicidad de este virus es H, que media la adherencia de los virus con los sitios receptores de la superficie de la célula a infectar y la subsecuente fusión de la envoltura viral con la membrana celular para permitir la entrada de la nucleocápside al interior de la célula, en los estados iniciales de la infección. Antigénicamente, es también la proteína más importante para inducir la respuesta inmune humoral y con ellos protección por seroneutralización.

La composición química de un virión de IA es: 70% proteínas, 20% lípidos, 5-8% carbohidratos y 0.8-1.0% RNA<sup>18</sup>. Las glicoproteínas y los glicolípidos contienen a los carbohidratos (galactosa, manosa, fucosa, y glucosamina)<sup>19</sup>, excepto a la ribosa que forma parte del RNA. La envoltura contiene a los lípidos (la mayoría fosfolípidos), ya que son derivados de la célula huésped.

### ***Diseminación.***

Esta ocurre, a través de las diminutas gotas de los aerosoles provenientes del tacto respiratorio o a través de las heces, ya sea de manera directa, en el agua o alimento contaminados.

### ***Signos y métodos diagnósticos***

Los signos clínicos de A están influenciados por factores como: la cepa viral involucrada, la especie, edad y condición inmunológica del huésped hacia el virus, el nivel de estrés e intensidad del manejo, así como el exceso de amoníaco o polvo, en caso de aves de producción. En las infecciones con virus altamente patógenos los signos que están asociados son: cese en la ovoposición, lagrimeo excesivo, sinusitis, edema de la cabeza y cara, cianosis cutánea, diarrea y ocasionalmente signos nerviosos; además de la posible muerte súbita.

Los métodos diagnósticos utilizados en México para la detección de la presencia del virus de IA son: la inhibición de la hemoaglutinación, y el aislamiento viral. Estas pruebas se encuentran detalladamente descritas en la Norma Oficial Mexicana correspondiente<sup>6</sup>.

### ***Perspectiva actual en la vacunación***

Después de la bioseguridad, la vacunación es la mejor opción de control del virus de IA<sup>20</sup>. En México, desde 1995 se usa una vacuna de virus inactivado en emulsión que se elabora a partir de la cepa oficial que distribuye PRONABIVE y desde principios de 2006 se aprobó el uso de una vacuna recombinante que expresa antígenos de H5N2 en virus de viruela aviar. Aparentemente, el antígeno H es el más importante inmunológicamente<sup>13</sup>, pero se han presentado algunos problemas en el control de la circulación del virus ya que por tratarse de una vacuna de virus inactivado, aunque se disminuye la presencia de los signos de enfermedad no se previene la infección ni se elimina la diseminación del virus<sup>5</sup> y por otro lado, desde el desarrollo de la vacuna en 1994, existen reportes que indican que la H de las cepas circulantes en México han sufrido varios cambios antigénicos que podrían sugerir que la cepa vacunal no genera la misma protección que antes<sup>21</sup>.

En el caso de la vacuna recombinante, existen estudios en los que se demostró que ésta reduce los signos clínicos y disminuye la eliminación del virus por cloaca y tracto respiratorio<sup>22</sup>, aunque no protege totalmente de la infección<sup>23</sup>.

### ***Impacto económico de IA***

Desde su aparición hasta la fecha, el virus de IA ha causado grandes pérdidas económicas en diferentes países alrededor del mundo. A continuación se presentan algunos ejemplos.

En Pennsylvania en 1983/84 más de 17 millones de aves murieron o fueron sacrificadas por la aparición de 448 brotes de IA, causando pérdidas de USD \$ 146 millones<sup>24</sup>.

En Italia, entre diciembre de 1999 y abril de 2000 ocurrieron 413 brotes, con la consecuente pérdida de alrededor de 13 millones de aves<sup>1</sup>, que significó USD \$100 millones de pérdidas directas.

La mayoría de estos casos sucedieron por fallas en la bioseguridad, prevención, control y/o lenta erradicación de la enfermedad.

### **Factor de transferencia (FT)**

Un inmunomodulador poco conocido pero que se ha usado desde hace poco más de 50 años, es el factor de transferencia<sup>25, 26</sup>. El FT es un conjunto de moléculas, productos dializables<sup>27</sup> de bajo peso molecular (producidos en muy pequeña cantidad)<sup>28</sup> capaces de estimular la inmunidad celular; éstos son extraídos de las células inmunocompetentes (linfocitos) de donadores previamente inmunizados para ser inoculados a receptores no inmunes<sup>29, 64</sup>. El FT es obtenido por medio del lisado de los linfocitos del donador y

posteriormente pasado a través de una membrana de diálisis de un tamaño molecular menor a 12 Kda. La eficacia del FT ha sido comprobada en humanos en diferentes enfermedades como: cáncer, Herpes virus<sup>30,31, 32</sup>, síndrome Wiskott-Aldrich<sup>33</sup>, así como en ensayos experimentales tuberculosis<sup>34</sup>, glioma<sup>35</sup> y VIH<sup>36</sup>; en medicina veterinaria se ha empleado en el tratamiento de enfermedades bacterianas<sup>37</sup> y se ha propuesto su uso como inmunomodulador tanto en cerdos<sup>38</sup> como en aves<sup>39, 67</sup>.

## **Reacción a los antígenos**

Además de la inmunidad innata con la que nacen las aves, existe la inmunidad adquirida que se requiere para establecer mecanismos específicos para que no sólo se eliminen los agentes patógenos sino que también se proteja en caso de un nuevo encuentro con el mismo patógeno<sup>40</sup>. Las células B y T tienen la capacidad de reconocer características moleculares de los diferentes antígenos y se sintetizan en los diferentes órganos inmunocompetentes de los individuos y cada tipo de células se divide en subtipos, con diferentes funciones específicas. En este trabajo se describe a IL2 e IFN  $\gamma$ , que son citocinas secretadas por los linfocitos y que a su vez se encuentran en su mayoría en el bazo de las aves.

### ***Bazo***

El bazo es un órgano inmunocompetente secundario y como tal, es persistente durante toda la vida de cualquier individuo, reacciona a estímulos antigénicos y su desarrollo es menor

en los animales libres de gérmenes. En general, estos órganos son ricos en macrófagos, células dendríticas y en linfocitos T y B, que fungen como mediadores de las reacciones inmunes<sup>41</sup>.

De manera macroscópica en las aves se observa al bazo como un órgano de forma esférica, de unos 2 cm de diámetro en las aves adultas, de color marrón rojizo y situado en el plano medio al lado del proventrículo y contacta con el hígado craneoventralmente<sup>42</sup> (Ilustración 1).

Las funciones del bazo en general son filtrar la sangre, reteniendo células envejecidas, así como partículas antigénicas; durante el desarrollo fetal participa en la eritropoyesis. De esta manera, se divide en pulpa roja, encargada de captación antigénica, eritropoyesis y almacenamiento de eritrocitos, y en pulpa blanca, enfocada a las inmunorreacciones.



**Ilustración 1. Localización anatómica del bazo (flecha).**

### ***Estructuras: pulpa blanca y pulpa roja***

El bazo está rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso de colágeno además de escasa musculatura lisa. Desde la cápsula se extienden numerosas trabéculas de tejido conectivo denso hacia el interior del parénquima, al que confieren rigidez y que así divide en gran cantidad de secciones comunicadas entre sí. En la superficie medial se encuentra el hilio, donde la cápsula está muy engrosada; a través del hilio penetran al órgano nervios, vías linfáticas y vasos sanguíneos<sup>43</sup>.

Cada arteriola se ve rodeada por una vaina linfoide periarteriolar, éstas son el componente principal de la pulpa blanca. La arteriola abandona esta vaina y se ramifica en arteriolas que poseen una pared característicamente engrosada, y crean una estructura llamada elipsoide. Estas arteriolas desembocan en senos venosos que a su vez drenan en las venas esplénicas. La vaina linfoide periarteriolar está formada en su mayoría por linfocitos T, y de manera más dispersa, por folículos primarios (cuya mayoría son linfocitos B)<sup>44</sup>.

Cuando se presenta un estímulo antigénico, los folículos primarios desarrollan centros germinales y una capa de linfocitos T forma un manto que rodea a cada folículo<sup>43</sup>.

## **Linfocitos**

Los linfocitos son las únicas células capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos y por tanto, son responsables de dos

características importantes de la respuesta inmune adquirida: especificidad y memoria<sup>44</sup>. Ésta respuesta inmune adquirida, a su vez puede ser humoral (a cargo de los linfocitos B) o celular (linfocitos T), pero este apartado se enfocará exclusivamente a la respuesta inmune celular.

De manera normal, los linfocitos son células redondeadas que se encuentran en órganos linfoides como timo, bazo, y en menor proporción, en la sangre circulante<sup>45</sup>. Su tamaño varía entre 7-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Poseen un núcleo grande y redondo, tienen un borde delgado de citoplasma con algunas mitocondrias, ribosomas libres y un pequeño aparato de Golgi.

La manera en la que se pueden identificar los diferentes tipos de linfocitos es con base en su inmunofenotipo por medio del reconocimiento de sus proteínas de superficie. Las estructuras más importantes en la superficie de los linfocitos son sus receptores de antígeno, denominados receptores de linfocitos T (TCR) y receptores de linfocitos B (BCR).

Se aplica la designación de CD3 al complejo de proteínas del TCR que actúan como transductores de señales. Su función es llevar una señal desde el receptor hasta la célula cuando el TCR se une a algún antígeno. Por tanto, todos los linfocitos T tienen CD3<sup>46</sup>. CD4 sólo existe en los linfocitos T que reconocen al antígeno procesado por vía exógena, es decir, los linfocitos T cooperadores (LTh). Esta molécula actúa como un receptor de linfocitos T para moléculas MHC clase II. Por otro lado, sólo existe CD8 en los linfocitos

T citotóxicos; el CD8 es un receptor para moléculas MHC clase I<sup>45</sup> y es necesario para reconocer antígenos procesados por vía endógena.

### ***Linfocitos T citotóxicos (LTc)***

Este tipo de células son específicas de la respuesta inmune celular y se encargan de eliminar células blanco, tales como las que han sido infectadas por virus o células neoplásicas que han atraído antígenos endógenos<sup>44</sup>. El primer paso para la activación de los LTc involucra la unión de los receptores de las células T (TCR) a un complejo MHC clase I-antígeno-péptido y la unión del CD8 a una región conservada de la molécula MHC clase I. Una vez que ha ocurrido la interacción entre el CD8 de la célula T y la célula blanco, son necesarias las señales de las células Th1, como IL2 o IFN  $\gamma$ . Posteriormente los LTc proliferan y se diferencian ya sea en células efectoras o en células de memoria. Los mecanismos efectoras involucran la unión del LTc a la célula blanco, reacción mediada en parte por la unión del TCR y CD8 a los ligandos de la célula, entre otros mecanismos. Una vez que están unidos, los gránulos dentro del linfocito Tc (con productos citolíticos como perforinas, granzimas y citolisinas) se mueven hacia el área de contacto Tc-célula blanco y el contenido de los gránulos se libera por exocitosis<sup>44</sup>.

### ***Linfocitos T cooperadores (LTh)***

Las LTh se activan mediante el reconocimiento de un antígeno del MHC clase II en una célula presentadora de antígenos. Después de la activación, la LTh empieza a dividirse y

da origen a gran número de células efectoras, con la misma especificidad antigénica. Éstas células Th secretan varias citocinas, que juegan un papel central en la activación de células B, LTc y otras células que participan en la respuesta inmune. Los cambios en el patrón de citocinas producidas por las células Th pueden modular el tipo de respuesta inmune que se desarrolla entre los demás leucocitos. La respuesta Th1 produce un perfil de citocinas que promueve la inflamación y principalmente activa a las células T y a los macrófagos: en cambio, la respuesta Th2 activa principalmente a las células B y la respuesta inmune dependiente de anticuerpos.

## **Citocinas**

Las citocinas son proteínas o glicoproteínas reguladoras de aproximadamente 30 Kda secretadas principalmente por los linfocitos y otras células del cuerpo, como respuesta a estímulos antigénicos. Estas proteínas asisten en la regulación de la intensidad y duración de la respuesta inmune ya sea estimulando o inhibiendo la activación, proliferación y/o diferenciación de varias células y regulando la secreción de anticuerpos o incluso otras citocinas. La actividad de las citocinas se reconoció por primera vez en la década de 1960, cuando en los sobrenadantes derivados de cultivos *in vitro* de linfocitos se encontraron factores que podían regular la proliferación, diferenciación y maduración de células del sistema inmune.

El término citocina incluye a aquellas secretadas por los linfocitos, antes llamadas linfocinas, y aquellas otras citocinas secretadas por los monocitos y macrófagos, antes

llamadas monocinas. Aunque estos términos aún se utilizan, han caído en desuso ya que la secreción de estas citocinas no está limitada a las células que su nombre indica. Por esta razón, su nombre actual es el más aceptado.

Las citocinas secretadas por linfocitos activados por antígenos (aunque sean pocos) pueden influenciar la actividad de numerosas células involucradas con la respuesta inmune. Por ejemplo, las citocinas producidas por células Th activadas pueden inducir la activación de células B, células Tc, células NK, macrófagos, granulocitos y células pluripotenciales, etc<sup>45</sup>.

### ***Interleucina 2 (IL 2)***

Esta citocina se encuentra en los esplenocitos y en menor proporción, en sangre periférica<sup>47</sup>. Pertenece a la familia estructural hematopoyetina y sus receptores son de citocinas clase I. Como dato general, IL 2 recibe su nombre porque indica que son secretadas por algunos leucocitos y su acción es sobre otros leucocitos.

En buen porcentaje, IL 2 es similar entre mamíferos (como equinos y bovinos) y aves<sup>8, 48</sup>, tanto en estructura como en funciones. Pero a decir verdad, es poco lo que se sabe de IL 2 aviar. Existen estudios en los que se ha clonado esta citocina y se han descrito sus receptores<sup>48</sup>.

Entre las funciones de esta citocina están el tener un papel importante para la proliferación de LTc<sup>44, 49</sup>, diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas<sup>50</sup> así como células NK<sup>48</sup> y para la clonación de linfocitos específicos de antígeno<sup>51</sup>. Otra propiedad digna de ser destacada es la de funcionar como adyuvante en la vacunación<sup>52, 53</sup>. Debido a estas funciones tan variadas se reconoce a IL 2 como una molécula inmunorreguladora importante<sup>54</sup> tanto en aves como en mamíferos.

### ***Interferón gamma (IFN ?)***

Es bien sabido que esta citocina también forma parte del perfil Th1 y que es una de las más importantes en la respuesta inmune celular y el control de los agentes infecciosos<sup>55, 56</sup>. Por su estructura, pertenece a la familia de interferón y posee receptores de citocinas clase II. IFN ? activa a los macrófagos, estimulando su acción microbicida, regula de manera positiva el nivel del MHC clase II y secreta citocinas como IL12, la cual induce a las células Th a diferenciarse en Th1 (creando retroalimentación positiva). IFN ? es una citocina que media la inflamación y su secreción se relaciona con fenómenos inflamatorios tales como la hipersensibilidad tardía. Junto con IL 2, IFN ? promueve la diferenciación a células T completamente citotóxicas<sup>44</sup>; este patrón de producción de citocinas hace al subtipo Th1 apropiado para responder a infecciones virales así como a patógenos intracelulares. IFN ? desempeña un papel importante en la activación de los macrófagos y la modulación del sistema inmune, además de su actividad antiviral. Finalmente, IFN ? inhibe la expansión de la población de Th2.

## PCR y RT-PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utiliza como su nombre lo indica, a la enzima polimerasa como principal ayuda ya que ésta, de manera natural se encarga de la catalización y reparación del DNA y RNA<sup>57</sup>. La adecuada replicación de toda materia viviente depende de su actividad<sup>58</sup>, y en el laboratorio se ha logrado manipular esta actividad. Kary Mullis (creador de esta técnica) se dio cuenta que controlando esta enzima, cualquier DNA blanco podría ser amplificado exponencialmente (ilustración 2).

Ciclo—copias
1—2
2—4
3—8
4—16
5—32
6—64
7—128
8—256
9—512
10—1,024
11—2,048
12—4,096
13—8,192
14—16,384
15—32,768
16—65,536
17—131,072
18—262,144
19—524,288
20—1,048,576
21—2,097,152
22—4,194,304
23—8,388,608
24—16,777,216
25—33,554,432
26—67,108,864
27—134,217,728
28—268,435,456
29—536,870,912
30—1,073,741,824

**Ilustración 2. Ejemplo de amplificación exponencial.**

Koshland y Levy Guyer describen a la PCR de la siguiente manera:

*El material inicial para la PCR, la “secuencia blanco”, es un gen o segmento de DNA. En cuestión de horas, esta secuencia blanco puede ser amplificada millones de veces. Las cadenas complementarias de una molécula de DNA de doble cadena son separadas por calor. Dos pequeñas piezas de DNA sintético, cada uno complementando una secuencia específica a cada extremo de la secuencia blanco, sirven como iniciadores. Cada iniciador se fija a su secuencia complementaria. Las polimerasas inician en cada iniciador y copian la secuencia de esa cadena. Dentro de poco tiempo, réplicas exactas de la secuencia blanco han sido producidas. En ciclos subsecuentes, tanto las moléculas de DNA copia como las originales son separadas; los iniciadores se fijan otra vez a las secuencia complementarias y la polimerasa las replica. Al final de muchos ciclos, el conjunto está altamente enriquecido con las pequeñas piezas de DNA que tienen las secuencias blanco, y entonces esta información genética amplificada está disponible para análisis posteriores<sup>59</sup>.*

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa es la técnica más sensible para la detección del mensajero de RNA (RNAm), incluso en muestras muy pequeñas<sup>60</sup>. La particularidad de este PCR radica en que utiliza la enzima transcriptasa inversa (RT en inglés) para poder formar un DNA copia (DNAc) que servirá como templete en la amplificación del PCR.

## **Electroforesis**

En la Biología moderna, es frecuente que las investigaciones se enfoquen con gran detalle en moléculas particulares, las cuales, de manera igualmente frecuente se encuentran en especímenes complejos y en bajas concentraciones. La detección y especialmente la medición de éstas, requiere de métodos que sean altamente específicos o que sean capaces de separar materiales con el fin de revelar todo aquello que sea de nuestro interés.

De manera ideal, se necesitan técnicas que puedan ser realizadas utilizando muestras muy pequeñas, que puedan separar simultáneamente grandes números de componentes, que induzcan el mínimo cambio en las propiedades químicas y biológicas, que tengan alguna clase de marca visible y que además proporcionen una medida cuantitativa; **Error!**

### **Marcador no definido..**

De manera general, se puede definir a la electroforesis como la separación de moléculas basada en su migración en un campo electromagnético. La primera descripción de este fenómeno fue dada por Ferdinand Frederik Reuss en 1809, para que en 1937, Arnie Tiselius desarrollara un aparato para la prueba y en la década de 1960, Hjertèn describió la electroforesis zonal como la que se utiliza hasta estos días<sup>61</sup>.

La mayoría de los factores que afectan las separaciones electroforéticas están asociados con la muestra por sí misma, el campo eléctrico y el medio en el cual se lleva a cabo la prueba. Además, es crucial entender aquellas características de las moléculas que afectan el rango y la dirección de su movimiento en un campo eléctrico. Ciertas diferencias en su estructura así como algunas propiedades (como presencia y distribución de áreas

hidrofóbicas, tamaño y forma de la molécula, entre otras) se pueden utilizar como base de su separación.

## **Objetivo**

Determinar la expresión del RNAm de IL2 e IFN $\gamma$  en bazos de aves tratadas con tres dosis del FTAe mediante la técnica de RT-PCR.

## **Justificación**

La importancia de este trabajo radica en que se evaluará si el Factor de Transferencia específico para Influenza Aviar (FTAe) induce una mejor respuesta inmune celular en aves al determinar la expresión de IL2 e IFN $\gamma$ , y de ser así, podría recomendarse su empleo como un inmunomodulador de elección que mejore la respuesta a la vacunación.

## **Hipótesis**

El FTAe aplicado en aves aumentará la expresión del RNAm para producción de citocinas IL2 e IFN- $\gamma$ . Si es capaz de modular la respuesta inmune, entonces se podrá detectar su expresión.

## **Material y métodos.**

### ***Obtención del FTAE:***

El FTAE se obtuvo a partir de los bazos de 10 pollos inoculados con virus inactivado de IA. Cada pollo de 7 días de edad recibió cuatro inmunizaciones por vías: SC, IM e intradérmica a los días 0, 7, 13 y 16. Después de haber obtenido los bazos, se maceraron con una malla de aluminio con 30 mL de SSF. El macerado se sometió a 10 ciclos de congelación-descongelación y se dializó en tubos Amicon® ultra con corte de 10 Kda por centrifugación a 5000 gravedades. El dializado se esterilizó con filtración en membrana de 0.22 micras y se alicuotó en tubos de 1 mL

### ***Tratamiento con FTAE:***

La población constó de 52 pollos machos clínicamente sanos de diez días de edad, de la línea Ross, vacunados contra la enfermedad de Marek, alimentados con alimento comercial\* y agua potable *ad libitum* y mantenidos bajo las siguientes condiciones medio-ambientales:

A partir del día de edad se alojaron dentro de criadoras de 90 x 41 x 65 cm, en donde se controló la temperatura a 32° C al inicio del experimento y disminuyó a razón de 2° C cada 5 días hasta que alcanzaron los 20 días de edad.<sup>62</sup>

---

\* Alimentos La Hacienda.

Las criadoras se ubican en el animalario de la FMVZ UNAM que tiene una temperatura ambiental de  $18.5^{\circ}\text{C} \pm 1$ , humedad relativa 45.5%, ventilación continua, por medio de 2 extractores, con un ciclo de iluminación 12 h: 12 h (L:O) por medio de 2 lámparas de luz blanca de 38 watts cada una.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos como se muestra a continuación:

- Grupo 1: 13 pollos inoculados con 0.1U de FTAE por vía subcutánea.
- Grupo 2: 13 pollos inoculados con 1.0U de FTAE por vía subcutánea.
- Grupo 3: 13 pollos inoculados con 10U de FTAE por vía subcutánea.
- Grupo 4: 13 pollos inoculados con 0.5mL de placebo (SSF) por vía subcutánea.

### ***Obtención de bazo.***

El método de sacrificio fue por dislocación cervical de acuerdo con las especificaciones del manual de manejo de animales de laboratorio<sup>63</sup> y con la Norma Oficial Mexicana pertinente.<sup>64</sup>

Al inicio del experimento (día cero) se tomó el bazo de un animal de cada grupo. Posteriormente a los 4, 7 y 10 días se obtuvo el bazo de cuatro animales por grupo, se

maceraron, se almacenaron en viales de 1.5 mL con 500  $\mu$ L de Trizol®<sup>†</sup> y se congelaron a -40°C hasta su utilización.

### ***Obtención de RNA y RT-PCR***

Se realizó la extracción de RNA de cada una de las muestras obtenidas, siguiendo el protocolo que marca el laboratorio que produce Trizol®. El RNA total se transcribió a DNA copia (DNAc) usando un transcriptasa inversa MMLV-RT<sup>‡</sup> y un oligo dT mediante el siguiente protocolo:

La muestra de RNA se centrifugó a 14,000g/20min, se retiró el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 500 $\mu$ L de etanol al 80% en agua DEPC (dietil pirocarbonato), posteriormente se centrifugó 6000 rpm/5min, se retiró todo el etanol. La “pastilla” de RNA se secó a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar<sup>§</sup> durante 5 minutos.

Posteriormente el RNA se resuspendió en 13mL de agua DEPC, se le adicionaron 2mL de oligo dT, y se incubó en baño maría a 45°C/5min. A continuación se colocó en hielo y se le adicionaron 15mL de la mezcla de reacción (MR) y se realizó el RT-PCR en un

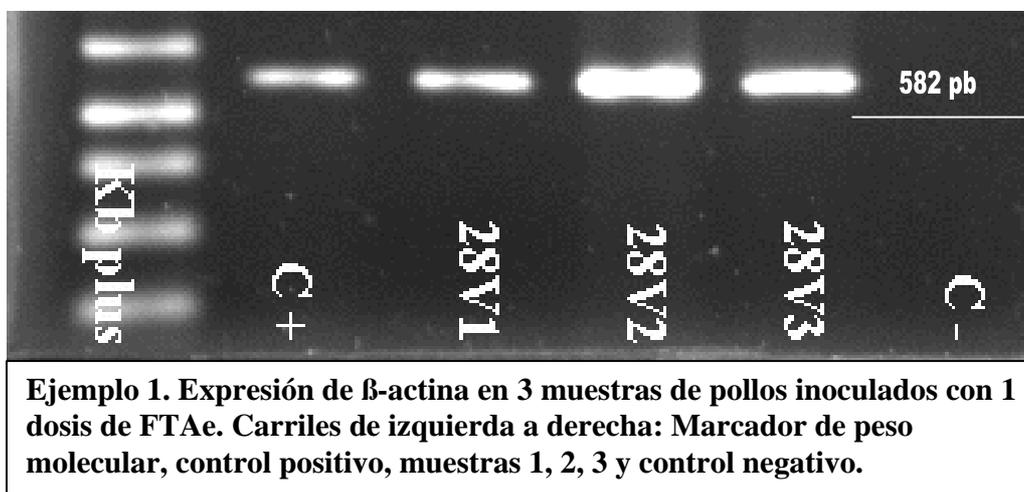
---

<sup>†</sup> Marca registrada de Molecular Research Center, Inc.

<sup>‡</sup> Invitrogen Life Technologies. Cat. No. 15596026

<sup>§</sup> Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet.

termociclador<sup>\*\*</sup>; terminada la reacción se añaden 20 mL de agua DEPC quedando un volumen final de 50 µL por muestra. La muestra se congeló a -20° C hasta su utilización.



### *Determinación de la expresión de citocinas.*

Se utilizaron 2.5 mL del DNAc en una reacción de PCR para detectar el RNAm de  $\beta$ -actina<sup>††</sup>, utilizando la siguiente mezcla de reacción: Agua DEPC, solución amortiguadora 10x, MgCl<sub>2</sub> 0,05 mM; dNTP's 200 µM; iniciadores, 0,2 µM cada uno; Taq polimerasa 5 U.

Con estos iniciadores:

F: CCC TGA AGT ACC CCA TTG AAC ACG

R: CCT CGG GGC ACC TGA ACC TCT

<sup>\*\*</sup> PTC-100. MJ Research, Inc. U. S. A.

<sup>††</sup> Con termociclador Techne

Y estas condiciones:

- 30 ciclos a 94° C/45 s para la disociación, 60° C/45 s para la asociación, 72° C/90 s para la extensión.
- Y una extensión final a 72° C/7 minutos.

Se realizó la técnica de electroforesis<sup>65</sup> zonal<sup>††</sup> a 90 volts durante 80 minutos un gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% y se visualizó en un digitalizador de imágenes<sup>§§</sup>(ejemplo 1).

En los casos positivos al RNAm de  $\beta$ -actina se procedió a la determinación de IL-2 e IFN $\gamma$  utilizando los iniciadores correspondientes. Las condiciones establecidas para la PCR para IFN $\gamma$  fueron:

- Un ciclo a 94° C/2 minutos.
- 30 ciclos a 94° C/45 s para disociación; 53° C/45s para asociación y 72° C/90 s para extensión.
- Una extensión final a 72° C/7 minutos.

La mezcla de reacción utilizó: Agua DEPC, 15.2  $\mu$ L; solución amortiguadora 10x, 2.5  $\mu$ L;

MgCl<sub>2</sub>, 2 mM; dNTP's 200 $\mu$ M; iniciadores 0.2  $\mu$ M, cada uno; y taq-polimerasa 1 U.

Y 5  $\mu$ L de DNAc de cada muestra.

---

<sup>††</sup> Cámara de electroforesis y fuente de poder. Amersham Biosciences Corp. U. S. A.

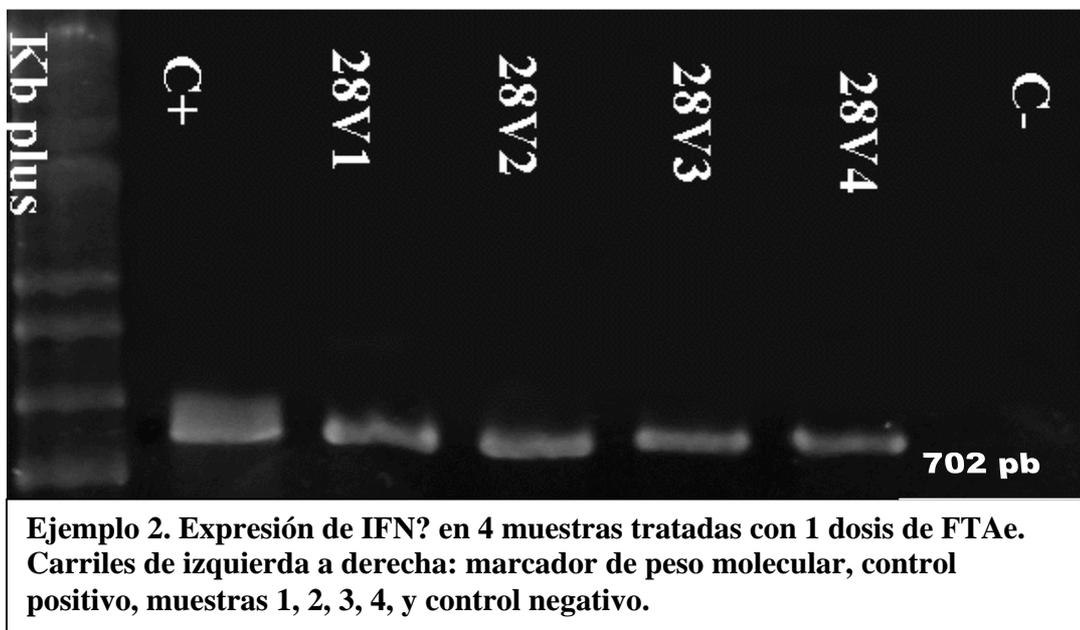
<sup>§§</sup> Gel Logic 200 Imaging System

Los iniciadores fueron<sup>72</sup>:

F: GTG AAG AAG GTG AAA GAT ATC ATG GA

R: GCT TTG CGC TGG ATT CTC A

Producto esperado: 702 pb (ejemplo 2).



Y las condiciones establecidas para la PCR para IL-2 fueron:

- Un ciclo a 92° C durante 75 s.
- 30 ciclos a 92° C durante 45 segundos para disociación; 50° C durante 60 segundos para asociación; 72° C durante 60 segundos para extensión.

- Y una extensión final a 72° C durante 7 minutos.

La mezcla de reacción utilizó: Agua inyectable, 13.55  $\mu$ L; solución amortiguadora 10x, 2.5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM; dNTP's 200 $\mu$ M; iniciadores 0.8  $\mu$ M cada uno; gelatina molecular, 0.01%; y taq-polimerasa 1 U.

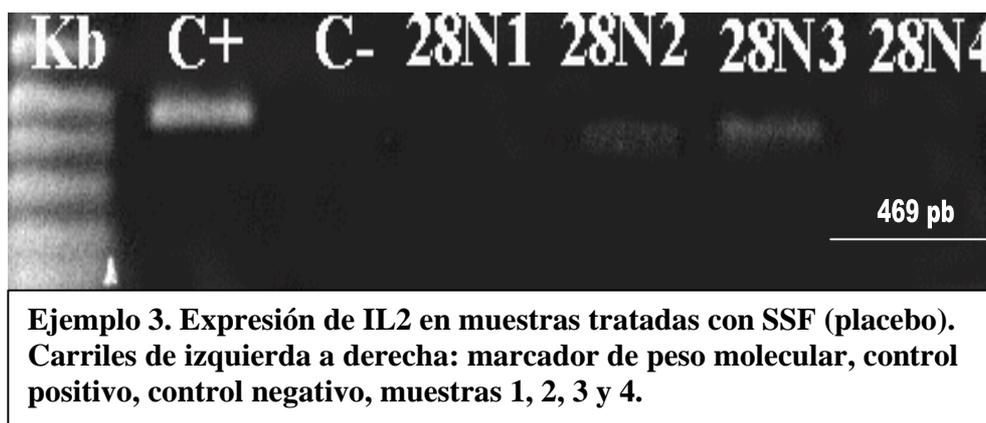
Y 2.5  $\mu$ L de cada DNAc de cada muestra.

Con los iniciadores<sup>66</sup>:

F: AGT GTT ACC TGG GAG AAG T

R: TTA CCG ACA AAG TGA GAA TC

Producto esperado: 469 pb (ejemplo 3).



La presencia de las bandas analizadas se determinó utilizando un analizador de imágenes<sup>\*\*\*</sup>. La expresión del RNAm se midió como: positiva o negativa de acuerdo a su observación.

### **Análisis de resultados.**

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Ji-cuadrada (de homogeneidad) y para observar el comportamiento del RNAm en el tiempo se utilizó la correlación de Spearman<sup>67</sup>. Las pruebas tanto para IL 2 como para IFN $\gamma$  se realizaron por separado.

---

<sup>\*\*\*</sup> Kodak Imaging Software V.4.0.2

## **Resultados**

Al analizar la variable IL2, se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos. Como se puede observar en el cuadro 1, en el tratamiento 1 (0.1 dosis) el 75% de los animales fue negativo y el 25% fue positivo; en el tratamiento 2 (1 dosis), el 41.67% fue negativo, mientras que el 58.33% fue positivo (mejor tratamiento). En el tratamiento 3 (10 dosis), el 100% resultó negativo. En el tratamiento 4 (placebo SSF), se observaron los mismos resultados que en el tratamiento 1, es decir, 75% negativos y 25% positivos (cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Proporción de expresión de Interleucina 2 (IL 2) por tratamiento (%).</b>		
TRATAMIENTO	NEGATIVO A IL2 (%)	POSITIVO A IL2 (%)
<b>1</b> (0.1 DOSIS)	75 (9/12)	25 (3/12)
<b>2</b> (1 DOSIS)	41.67 (5/12)	58.33 (7/12)
<b>3</b> (10 DOSIS)	100 (12/12)	0 (0/12)
<b>4</b> (PLACEBO SSF)	75 (9/12)	25 (3/12)

Con respecto a IFN $\gamma$  la prueba de homogeneidad no detectó diferencia significativa ( $P>0.05$ ), por lo que todos los tratamientos son homogéneos con respecto a la distribución de positivos y negativos para IFN $\gamma$  (cuadro 2).

<b>Cuadro 2. Proporción de expresión de Interferón <math>\gamma</math> (IFN<math>\gamma</math>) por tratamiento. (%)</b>		
TRATAMIENTO	NEGATIVO A IFN $\gamma$ (%)	POSITIVO A IFN $\gamma$ (%)
<b>1</b> (0.1 DOSIS)	(5/12) 41.67	(7/12) 58.33
<b>2</b> (1 DOSIS)	(8/12) 66.67	(4/12) 33.33
<b>3</b> (10 DOSIS)	(3/12) 25	(9/12) 75
<b>4</b> (PLACEBO SSF)	(4/12) 33.33	(8/12) 66.67

No se observó correlación significativa ( $P>0.05$ ) entre IFN $\gamma$  y tiempo, IFN $\gamma$  y tratamiento, e IL2 y tiempo.

## Discusión

Este es un estudio preeliminar en el que se buscó qué dosis de FTAe modificaba en mayor grado la expresión de 2 citocinas importantes en la respuesta inmune celular, ya que la literatura actual no hay datos que establezcan la dosis que deba usarse específicamente para aves. Además se pretendió establecer una base para que en trabajos posteriores se puedan delimitar las variables involucradas.

Simon *et al*<sup>58</sup> establecieron el equivalente a 1 dosis como el extracto obtenido a partir de  $1.2-9.6 \times 10^8$  células/mL en perros. Williams, *et al*<sup>69</sup> emplearon  $5 \times 10^8$  células/mL como una dosis en ratones, mientras que en humano se reporta una dosis como el producto obtenido a partir de 500 mL de sangre periférica (aproximadamente  $5 \times 10^8$  células); en este trabajo se decidió establecer un equivalente basado en el trabajo de Fabre<sup>34</sup> en donde se emplean bazos de ratón y la dosis con mayor efecto es equivalente a  $1 \times 10^6$ . Así, en esta tesis se estableció como una dosis el producto obtenido a partir de  $4 \times 10^6$  células; interesantemente, esta dosis fue la que resultó dar un mayor efecto, lo que indica que la cuenta celular podría ser empleada para calcular la dosis de FT aviar; en este sentido se considera que para aplicaciones futuras sería más práctico establecer la dosis con base la concentración peptídica. Empleando el micrométodo de ácido bisinconínico (BCA), se estableció que el producto equivalente una dosis de FTA contiene  $7.3 \mu\text{g/mL}$  de péptidos.

Se observó que los animales con los diferentes tratamientos sólo expresaron el mensajero para IL2; como se observa en cuadro 1, el 58.33% de los animales tratados con una dosis de FTA y el 25% de los animales sin tratamiento expresaron IL2; el hecho de que algunos testigos negativos expresaran esta citocina pudo deberse, a que los pollos no estuvieron totalmente aislados y se sabe que la inducción de IL2 se puede dar por diversos estímulos antigénicos. Al hacer el análisis estadístico se establece que aún cuando tres testigos negativos expresan IL2, la cantidad expresada por los animales tratados FTA, es lo suficientemente grande como para establecer que una dosis de FTA induce una mayor expresión de IL2, con respecto a los testigos, con una probabilidad de error mínima ( $p < 0.05$ ).

Un resultado inesperado fue que al emplear 10 dosis de FTAe el 100% de los animales no expresaron IL2. Se podría pensar que estos animales expresaron el mensajero en un tiempo más corto con respecto a los tratados con una dosis; se sabe que la producción de IL2 es transitoria, de manera que al hacer el muestreo de los bazos esta citocina podría haberse dejado de expresar; para demostrar esto, se tendría que hacer un ensayo con muestreos postratamiento más cortos (antes de los 4 días).

Al hacer el análisis con los datos obtenidos para el IFN $\gamma$ , no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos, este resultado fue contrario a lo esperado, ya que en estudios previos<sup>34, 38, 70</sup> se expresó el mensajero para IFN $\gamma$ ; habría que evaluar si realmente no se indujo su expresión o si en este trabajo no pudo ser detectado, ya sea porque se expresó en niveles muy bajos o durante un periodo de tiempo que no fue evaluado. También es probable que en este estudio no se modulara la expresión de IFN $\gamma$ , debido a que los

animales fueron inoculados con FTA, pero sin el estímulo antigénico (IA); en un estudio realizado en el laboratorio<sup>71</sup> en el que se evaluó la respuesta inmune en aves tratadas con FTA y una vacuna contra IA, se encontró que a diferencia de los animales sin vacunar, aquellos que recibieron 1 dosis de FTA junto con la vacuna indujeron el 100% de expresión de IFN $\gamma$ . Aunque estos resultados no forman parte de esta tesis, refuerzan la idea de realizar estudios posteriores aplicando una dosis de FTAE junto con la vacuna comercial.

No se observó correlación significativa ( $P > 0.05$ ) entre el tiempo y la expresión de IL2 e IFN $\gamma$ , lo que se puede atribuir a que en este estudio se utilizaron lapsos de tiempo largos (3 y 4 días)<sup>72</sup> en la toma de muestra, a diferencia de otros autores que han utilizado períodos de 24 horas<sup>69</sup>. Debido a que no se encontraron diferencias entre tiempos, en estudios posteriores se buscará la expresión de estas citocinas, para tratar de determinar una cinética de su expresión en intervalos más cortos de tiempo entre el día 0<sup>73</sup> y el día 4<sup>72</sup> postratamiento.

La vía de administración elegida fue SC ya que es la misma que se utiliza con la vacuna comercial. La perspectiva de este proyecto es que en el futuro el FTAE sea aplicado junto con la vacuna contra influenza y de esta manera no aumentar el manejo de los animales. El estudio de la viabilidad de la vacuna con algún tipo de adyuvante puede dar opción a otras investigaciones. Kirkpatrick *et al*<sup>74</sup>, han evaluado la respuesta a la administración por vía oral con resultados favorables. Esto puede ser de mucha utilidad para modelos experimentales futuros.

Se puede concluir que si bien los resultados de este experimento no son suficientes para establecer el papel del FT en la inducción de citocinas, sí nos pueden servir de base para establecer que 1 dosis FT Ae muestra una tendencia a modular la expresión del ARNm de las citocinas estudiadas. Con base en esto se establece como prospectiva que deberán hacerse un mayor número de experimentos con un tamaño de muestra mayor para poder determinar el papel del FT en la vacunación contra IA empleando 1 dosis del mismo y finalmente habría que probar su papel ante un desafío con el virus de campo, lo que en última instancia le otorgaría validez a su posible aplicación en granjas comerciales.

## **Conclusión**

Se puede concluir que la inoculación de los pollos con 1 dosis FTAE indujo una mayor expresión del ARNm para IL2, sin que el tiempo transcurrido desde la inoculación haya influido de manera estadística en el resultado.

Se considera que el aporte de este trabajo es el establecimiento de 1 dosis de FTAE como base para trabajos futuros en pollos de engorda.

## Referencias

- <sup>1</sup> Capua, I. y Marangon, S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: A review. *Avian pathology* 29: 289-294 (2000).
- <sup>2</sup> Muhammad, K. and Muneer, M. A. Isolation and characterization of avian influenza virus from an outbreak in commercial poultry in Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*. 17: (1) 6-8 (1997).
- <sup>3</sup> Naeem, K. and Hussain, M. An outbreak of avian influenza in poultry in Pakistan. *Veterinary Record*.137: (17) 439 (1995).
- <sup>4</sup> Röhm, C. and Süß, J. Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chickens in Leipzig, Germany. *Virology* (New York). 218: (1) 253-257 (1996).
- <sup>5</sup> Swayne, D.E., *et al.* *Avian Pathol* 28: 245-55 (1999).
- <sup>6</sup> Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar. Modificación a la NOM-044-ZOO-1995 disponible en [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- <sup>7</sup> Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. La influenza aviar en México (memoria). México. 1995. 9-11. Comunicación gràfica y Representaciones P. J. (1997).
- <sup>8</sup> Sharma, J. M. *Avian Cellular Immunology*. 1º Edición. CRC Press. USA. 1991
- <sup>9</sup> Kromer, G. and Schauenstein, K. Avian lymphokines: an improved method for chicken IL-2 production and assay. A Con A-erythrocyte complex induces higher T cell proliferation and IL-2 production than does free mitogen. *Journal of immunology methods*. 73(2):273-81 (1984).
- <sup>10</sup> Lillehoj. H.S., Min, W., Choi, K., Babu, U., Burnside, J., Miyamoto, T. and Lillehoj, E., Functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. In: Schat, K.A.(Ed.), "Recent Progress in Avian

immunology". 2001. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA.

<sup>11</sup> Lillehoj, H.S., Choi, K.D., Jenkins, M.C., Vakharia, V.N., Song, K.D., Han, J.Y. and Lillehoj, E. P. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. *Avian Dis.* 44: 379–389 (2000).

<sup>12</sup> Calnek, B. Diseases of Poultry. 10<sup>o</sup> Ed. Iowa State University Press. U. S. A. 1997

<sup>13</sup> Jordan, F., Alexander, D. Poultry Diseases. 5<sup>o</sup> Ed. W. B. Saunders U. K. 2002

<sup>14</sup> Swayne, D. Zoonosis Update: Avian Influenza and Newcastle Disease. *JAVMA.* 222. 11. 2003

<sup>15</sup> Cox. N. *Orthomyxoviridae*. In: Van Regenmortel, R. (ed). Virus Taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press: San Diego. 585-597. 2000

<sup>16</sup> Fouchier, R. A. Munster, V. Wallensten, A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology* .Mar;79 (5): 2814-22 (2005).

<sup>17</sup> WHO Expert Committee. A Revision of the System of Nomenclature for Influenza Viruses: A WHO Memorandum. *Bull WHO* 58:585-591. (1980).

<sup>18</sup> Lamb, R. *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. In Field, B (ed). Fields Virology. Lippincott-Raven: NY. 1353-1395. 1996

<sup>19</sup> Klenk, H. The charaterization of influenza A viruses by carbohydrate analysis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 104: 247-257. (1983)

- <sup>20</sup> Beard, C. W. To vaccinate or not to vaccinate. Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. 258-263. 1986. United States Animal Health Association, Athens, GA, U. S. A.
- <sup>21</sup> Lee, Chang-Won., Senne, D. A. and Suarez, D. L. Effect of Vaccine Use in the Evolution of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Virus. *Journal of Virology*. 78: 15, 8372-8381 (2004).
- <sup>22</sup> Swayne, D. E., Beck, J. R., and Mickle, T. R. Efficacy of recombinant fowlpox vaccine in protecting chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Diseases* 41: 910-922. (1997).
- <sup>23</sup> Taylor, J. Weinberg, R., Kawaoka, Y. and Webster, R. G. Protective immunity against avian influenza induced by fowlpox virus recombinant. *Vaccine*. 6: 504-508. (1988).
- <sup>24</sup> Lasley, F. Economics of avian influenza: control vs. noncontrol. In: Proceedings of the second international symposium on avian influenza. Beard, C (ed). U. S. Animal Health Association: Richmond, VA, 390-399. 1986
- <sup>25</sup> Lawrence H. S. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substances and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest*. 34: 219-30 (1955)
- <sup>26</sup> Lawrence, H. S. The transfer of generalizad cutaneous hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by genes of the constituents of disrupted leukocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 33: 951-952. (1954).
- <sup>27</sup> Lawrence, H. S., Al-Askari, S., David, J., Franklin, E. and Zweiman, B. Transfer of immunological information in humans with dialysates of leukocytes extracts. *Trans. Ass. Amer. Physicians*. 76: 84-89. (1963)

- <sup>28</sup> Rozzo, S. J. and Kirkpatrick, C. H. Purification of transfer factors. *Archives of Medical Research*. 26 Spec No:S87-92 (1995).
- <sup>29</sup> Pineda, B. and Estrada-Parra, S. Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *Revista Alergia México*. 52(6):215-220 (2005).
- <sup>30</sup> Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamarina V, Ondarza R, Chavez R, Correa B, Monges A, Cabezas R, Calva C and Estrada García I. 1998. Comparative study of transfer factor and aciclovir in the treatment of herpes zoster. *Inter J Immunopharmacol*. 20: 521-535.
- <sup>31</sup> Steele RW, Myers MG, Vincent MM. Transfer factor for the prevention of varicella-zoster infection in childhood leukemia. *N Engl J Med* 1980. 303(7):355-9.
- <sup>32</sup> Padierna L, Godinez S, Díaz J, García E, Arguez MA, Velasco O, Padierna J, Estrada-Parra S. Factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología*, 1985. 11:293-299.
- <sup>33</sup> Levin, A. S., Spitler, L. E. and Stites, D. P. Wiskott-Aldrich Syndrome, A Genetically Determined Cellular Immunologic Deficiency: Clinical and Laboratory Responses to Therapy with Transfer Factor. *Journal of Immunology*. 166(5):3432-9 (2001)
- <sup>34</sup> Fabre, R. A. and Pérez, T. M. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. Department of Immunology, National School of Biological Sciences, National Polytechnical Institute, Mexico.

- <sup>35</sup> Castillo Guerra, E, G. Producción del Factor de Transferencia calostroal bovino para uso en el modelo de glioma C6. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México.
- <sup>36</sup> Fernández-Ortega, C., Dubed, M., Ruibal, O., Vilarrubia, O. L., Menéndez de San Pedro, J. C., Navea, L., Ojeda, M., Arana, M. J. Inhibition of in vitro HIV infection by dialysable leucocyte extracts. *Biotherapy*. 9 (1-3): 33-40. 1996.
- <sup>37</sup> Rojas BS. Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. Tesis de licenciatura. FMVZ, UNAM, D.F. 1987
- <sup>38</sup> Calzada, N. G. Uso en lechones de Factor de Transferencia y *Parapoxvirus* inactivado (Baypamun) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. Tesis de Maestría con especialidad en Immunología. ENCB, IPN. México. 2000.
- <sup>39</sup> Wilson GB. De Novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducers) obtained from bovine colostrums and milk. *Acta Virol*. 1988. 32: 6-18.
- <sup>40</sup> Erf, G. F. Cell-Mediated Immunity in Poultry. *Poultry Science*. 83: 580-590. (2004)
- <sup>41</sup> Tizard, I. *Inmunología Veterinaria*. 6° edición en español. McGraw-Hill Interamericana. México. 2002
- <sup>42</sup> Dyce, K. *Anatomía Veterinaria*. 2° edición en español. McGraw-Hill Interamericana. México. 1999.
- <sup>43</sup> Geneser, F. *Histología: Sobre bases moleculares*. 3° edición en español. Editorial Médica Panamericana. España. 2000
- <sup>44</sup> Abbas, A. *Inmunología celular y molecular*. 5° edición en español. España. 2004
- <sup>45</sup> Kubi, J. *Immunology*. 3rd edition. W. H. Freeman and Company. U. S. A. 1997

- <sup>46</sup> Chen, C-L., Pickel, J. M., Lathi, J. M. and Cooper, M. D. Surface markers on avian immune cells. In: *Avian Cellular Immunology*. Edited by Scharma, J. M. 1-22. CRC Press, Boca Raton, FL. 1991.
- <sup>47</sup> Myers, T. J., Lillehoj, H. S., Fetterer, R. H. Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet. Immunopathol.* 34: 97- 114. (1992).
- <sup>48</sup> Sundick, R. and Gill-Dixon, C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology.* 159: 720-725. (1997).
- <sup>49</sup> Gillis, S. and Smith, K. A. Long term culture of tumor specific cytotoxic T cells. *Nature* 268: 154-156. (1977).
- <sup>50</sup> Howard, M., et al. Interleukin 2 induces antigen reactive T-cell lines to secrete BCGF-I. *J. Exp. Med.* 158: 2024-2039. (1983).
- <sup>51</sup> Gillis, S. and Watson, J. Interleukin 2 induction of hapten specific cytolytic T-cells in nude mice. *Journal of Immunology* 126: 1245-1248. (1981).
- <sup>52</sup> Reddy, P. G., Blecha, F., Minocha, H. C., Anderson, G. A., Morrill, J. L., Fedorka-Cray, P. J. and Baker, P. E. Bovine recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine Herpesvirus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23: 61. (1989).
- <sup>53</sup> Flexner, C., Huegin, A. and Moss, B. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature.* 330: 259. (1987).
- <sup>54</sup> Robb, R. J., Interleukin 2: The molecule and its function. *Immunology today.* 5: 203-209. (1984).
- <sup>55</sup> Trinchieri, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr. Opin. Immunol.* 9: 17-23. (1997)

- <sup>56</sup> Xing, Z., and Schat, K. A. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *J. Virology*. 74:3605-3612. (2000).
- <sup>57</sup> King and Stanfield. 1990. 247. In *Making PCR: A Story of Biotechnology*. By Rabinow, P. The University of Chicago Press. U. S. A. 1997
- <sup>58</sup> Rabinow, P. *Making PCR: A Story of Biotechnology*. The University of Chicago Press. U. S. A. 1997
- <sup>59</sup> Koshland, D. Perspective. *Science*. 22 : 1541. (1989).
- <sup>60</sup> Dharmaraj, Sub. Disponible en [www.ambion.com/techlib/basic/rtPCR/index.html](http://www.ambion.com/techlib/basic/rtPCR/index.html)
- <sup>61</sup> Cobos, L., Castañeda, A. *Manual de Laboratorio. Prácticas de Inmunología*. 2° edición. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2005
- <sup>62</sup> Campabadal, et al. Condiciones ambientales e iluminación. *Avicultura profesional* 16: (4) 23. (1985).
- <sup>63</sup> Poole B. T. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*: 6<sup>th</sup> edition. Longman Scientific and Technical. England 1987.
- <sup>64</sup> Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999. Disponible en [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- <sup>65</sup> Hawcroft, D. M. *Electrophoresis: The Basics*. 1st edition. Oxford University Press. U. K. 1997.
- <sup>66</sup> Rothwell L, Young JR, Zoorob R, Whittaker CA, Hesketh P, Archer A, Smith AL, Kaiser P. Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *J. Immunol*. 2004 Aug 15;173 (4):2675-82

- <sup>67</sup> Daniel, W. Bioestadística: *Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4<sup>o</sup> edición. Limusa Wiley. México. 2004
- <sup>68</sup> Simon, M. R., Silva, J., Freier, D., Bruner, J. and Williams, R. Tuberculin-Specific Transfer Factor in Dogs. *Infection and Immunity*. 73-77. (1977).
- <sup>69</sup> Williams, M. E. and Kauffman, C. A. Transfer Factor: a Murine Model. *Infection and Immunity*. 27, 1: 187-191 (1980).
- <sup>70</sup> Alvarez-Thull, L., Kirkpatrick, C. H., Profiles of cytokine in recipients of transfer factors. *Biotherapy*. 9: 55-59 (1996).
- <sup>71</sup> Bravo, B. A., Téllez, N. R., Uribe, L. S., Valdés, V. L., Salmerón, S. F., Estrada, G. I. y Cobos, M. L. Efecto inmunomodulador del factor de transferencia aviar en aves domésticas. XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria (memoria). Veracruz. 2006.16. Reproducciones Instantáneas S. A. de C. V. (2006)
- <sup>72</sup> Loza, E. Utilización de la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador en vacunas de influenza aviar, y su evaluación inmunológica. Tesis Doctoral. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México. 2003.
- <sup>73</sup> Kogut, M. H., Genovese, K., Moyes, R. B., Stanker, L. H. Evaluation of Oral, Subcutaneous, and Nasal Administration of *Salmonella enteritidis*-Immune Lymphokines on the Potentiation of a Protective Heterophilic Inflammatory Response to *Salmonella enteritidis* in Day-old Chickens. *Can J Vet Res*. 62: 27-32. 1998
- <sup>74</sup> Kirkpatrick, C. H., Hamad, A. R. and Morton, L. C. Murine Transfer Factors: Dose-Response Relationships and Routes of Administration. *Cellular Immunology*. 164: 203-206 (1995).