



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR EL  
FACTOR DE TRANSFERENCIA AVIAR EN CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE GALLINAS  
DOMÉSTICAS.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

STEPHANIE URIBE LÓPEZ

Asesores:

Dra. Laura Cobos Marín

M en C. Jaime Alonso Navarro Hernández



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.

## DEDICATORIAS

Después de un arduo camino recorrido, tengo frente a mí, recuerdos agradables que me llenan de satisfacciones; así como errores de los que he aprendido y trabajado en ellos; estos momentos me han hecho madurar y aprender. Sin embargo, existen personas que formaron parte esencial para este logro.

Me es grato compartir y dedicar este trabajo al ser más especial de mi vida... mi madre; como muestra de gratitud, por que si para mí es una satisfacción, que para ti sea un triunfo.

A mis hermanos Víctor y Francisco por ser parte de este proceso.

A mi abuela Gloria, por su apoyo y amor incondicional.

A mis tías Yolanda y Leticia por su alegría y cariño; a mis tíos Alfonso (q.p.d.), José Luis y Francisco.

A mi prima Mayra por su ejemplo y cariño; a mis primas Nancy y Natalie por su apoyo.

Rene, por que quizá sin proponertelo, estuviste conmigo en momentos indispensables y formaste parte de locuras universitarias.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Virología que contribuyeron a la realización de este trabajo y fueron fuerte estímulo (Rodrigo, Cindy, Dra. Liliana y Dra. Ma. Magdalena).

## **AGRADECIMIENTO**

Proyecto financiado por el Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN226005).

A la Dra. Iris Estrada García, Dra. Mayra Pérez Tapia y Dra. Jeanet Serafín López, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, por su apoyo en esta Tesis.

A la Dra. Laura Cobos Marín por compartir su tiempo y conocimientos, por comprometerse y ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Jaime Alonso Navarro Hernández por su paciencia y por compartir sus conocimientos.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| Resumen  | 1  |
| Introducción   |    |
| Inmunidad  | 2  |
| Citocinas  | 6  |
| Factor de Transferencia  | 8  |
| Técnica de Transcripción Reversa- Reacción en Cadena<br>de la Polimerasa | 11 |
| Justificación  | 13 |
| Hipótesis  | 13 |
| Objetivo   | 13 |
| Objetivos Particulares   | 14 |
| Material y Métodos   | 15 |
| Estandarización de técnicas  |    |
| Obtención y cultivo CMSP   | 17 |
| Obtención de RNA y RT-PCR  | 19 |
| Transcripción inversa del RNA mensajero (RNAm)                           | 20 |
| Reacción en cadena de la polimerasa                                      | 21 |
| $\beta$ - Actina   | 22 |
| IL 2   | 22 |
| IFN $\gamma$   | 23 |
| Elaboración del FTA  | 25 |
| Experimento de inducción de la expresión de citocinas de CMSP<br>con FTA | 25 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| Resultados        | 27 |
| Discusión         | 33 |
| Conclusiones      | 38 |
| Literatura Citada | 39 |

## **ABREVIATURAS**

ADN= Acido desoxirribonucleico

ADNc= Acido desoxirribonucleico complementario

$\beta$  -actina= Beta actina

C= Control

CMSP= Cultivos de células mononucleares de sangre periférica

Con-A= Concavalina-A

CAP= Células Presentadoras de antígeno

dNTP's= nucleotidos

DLE= Extracto dializable leucocitario

DO= Densidad optica

DTT= Dithiothreitol

EDTA= Acido etilen diaminotetracético

F= Adelantar

FT= Factor de Transferencia

FTA= Factor de Transferencia Aviar

G= gravedades

g= gramo

i.d.= introdermorreacción

IL= Interleucina

IFN $\gamma$ = Interferón gama

Iono= Ionomicina

KDa= Kilodaltones

L:O= luz:obscuridad

LT= Linfocitos T

LTc= Linfocitos T citotóxicos

LTh<sup>+</sup>= Linfocitos T *helper* (cooperadores)

MEM= Medio Esencial Mínimo

MgCl<sub>2</sub>= Cloruro de magnesio

MGF= Factor de crecimiento melomonocítico

MHC= Moléculas de histocompatibilidad

ml= mililitro

min= minutos

Mm= mili moles

M-MLV RT= Moloney- Murine Leucemia virus Transcriptase Reversa

MTT= 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5diphenyltetrazolium bromide

NaCl= Cloruro de sodio

NK= *natural killer* (células asesinas naturales)

pb= pares de bases

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

R= Retrasar

PHA= Fitohemaglutinina

PMA= Acetato-formol-miristato

RI= Respuesta Inmune

RIC= Respuesta Inmune Celular

RNA= Acido ribonucleico

RNAm= Acido ribonucleico mensajero

RPMI= Medio Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR= Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

TCR= Receptor T

TGF- $\beta$ = Factor transformantes del crecimiento-beta

TLR= *Toll Like Receptor*

TNF= Factor de necrosis tumoral

Tx= Tratamiento

UFAW= Universities Federation for Animal Welfare

$\mu$ g= microgramo

$^{\circ}$ C= grados Celsius

$\mu$ l= microlitros

$\mu$ M= micro molares

## RESUMEN

**URIBE LÓPEZ STEPHANIE.** Inducción de la expresión de citocinas por el Factor de Transferencia Aviar en células mononucleares de sangre periférica en gallinas domésticas. (Bajo la dirección de: Dra. Cobos Marín Laura y M. en C. Navarro Hernández Jaime Alonso)

El objetivo fue valorar el empleo del Factor de Transferencia Aviar (FTA) como un inmunoestimulante; para ello se determinó la expresión de 2 citocinas que promueven la respuesta inmune celular: Interferón gama ( $IFN\gamma$ ) e Interleucina 2 (IL 2). La primera parte consistió en la estandarización del cultivo de células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas (CMSP), los mitógenos a utilizar, horas de extracción del RNA mensajero (RNAm) y las condiciones idóneas para la técnica de RT-PCR para ambas citocinas; la segunda parte fue la valoración *in vitro* de diferentes dosis de FTA, utilizando CMSP cultivados en placas de 24 pozos a una concentración de  $3 \times 10^6$  células en 1 ml de medio AIMV, se utilizó PMA con Ionomicina ( $0.025 \mu\text{g}/1 \mu\text{g}$ ) como mitógeno y las siguientes concentraciones de FTA:  $7.3 \mu\text{g}$ ,  $0.73 \mu\text{g}$  y  $0.073 \mu\text{g}$ ; a los cultivos se les extrajo el RNAm a las 3h, 6h y 9h. Se realizó la técnica de RT-PCR para determinar la expresión de IL 2 e  $IFN\gamma$ ; los resultados del ensayo *in vitro* fueron evaluados con un análisis de varianza, encontrándose que la máxima expresión de  $IFN\gamma$  ocurrió en las concentraciones de  $7.3 \mu\text{g}$  y  $0.73 \mu\text{g}$  de FTA a las 3 y las 6 h respecto a las 9 h ( $F=14.748$ ;  $P=0.0014$ ). La expresión de IL 2 no fue significativamente distinta entre las concentraciones  $7.3 \mu\text{g}$ ,  $0.73 \mu\text{g}$  y  $0.073 \mu\text{g}$  en ningún momento de observación ( $F=0.5387$ ;  $P=0.7086$ ).

Palabras clave: Factor de Transferencia, Interleucina 2, Interferón gama.

## INTRODUCCIÓN

### Inmunidad

El sistema inmune está formado por una compleja red de células y moléculas capaces de detectar y eliminar eficientemente, microorganismos extraños y células propias que hayan sufrido alguna alteración. Este sistema puede estudiarse en dos grandes rubros: la respuesta inmune innata o inespecífica y la respuesta inmune adquirida o específica.

La respuesta inmune innata, desde el punto de vista evolutivo es la más antigua y algunos de sus elementos pueden encontrarse en todos los organismos multicelulares. Ésta es la primera línea de defensa del organismo y consta de barreras mecánicas (como piel y mucosas), barreras químicas (como: lisozima, defensinas, complemento, proteínas de fase aguda, citocinas y quimiocinas) y barreras celulares, formadas por neutrófilos (heterófilos en aves), macrófagos y células asesinas naturales o *NK (natural killer)*. (Tizard I, 2000) (Abbas AK, 2004)

La respuesta inmune adquirida apareció hace unos 400 millones de años y se encuentra únicamente en vertebrados: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Tiene cuatro características: la primera es ser inducible, ya que necesita la presencia de un agente extraño (antígeno) para generar una respuesta; la segunda es ser específica, un individuo inmunizado con un antígeno específico, presenta inmunidad exclusivamente hacia dicho antígeno

al reconocer estructuras muy particulares de éste, llamados epítopos; la tercera característica es la memoria a un antígeno ya conocido, debido a que la segunda exposición ocasionará una respuesta más rápida y vigorosa; por último, la respuesta inmune adquirida puede ser transferible de un sujeto inmune a otro sujeto que no es inmune, ya sea por medio de un suero que contenga anticuerpos, por linfocitos T sensibilizados o por extractos celulares como el Factor de Transferencia. (Zavaleta LA, 2002).

La respuesta inmune adquirida tiene dos mecanismos llamados: Inmunidad humoral e inmunidad celular y ambas trabajan para responder ante los antígenos. Dentro de los componentes que la forman están los linfocitos B, T *helper* o cooperadores (Th), y linfocitos citotóxicos (LTc), citocinas y anticuerpos, así como los órganos linfoides primarios y secundarios.

Los órganos linfoides primarios: médula ósea, timo y bolsa de Fabricio (en aves) se encargan de producir o madurar a los linfocitos, mientras que los secundarios: bazo, tejido linfoide asociado a mucosas y ganglios linfáticos (en mamíferos) son los que almacenan a los linfocitos para iniciar una respuesta ante un antígeno. Tanto los linfocitos T como los B proceden de un precursor común existente en la médula ósea. Los linfocitos pre-B en aves migran a la bolsa de Fabricio (localizada dorsalmente a la cloaca), donde se maduran en linfocitos B; por su parte los precursores de los linfocitos T maduran en el Timo, localizado a lo largo y a ambos lados del cuello del ave, después migran a los órganos linfoides secundarios como el bazo, tonsilas cecales y la glándula Harderiana (membrana parpadeante paraocular) (Pastoret PP, 1998).

Los linfocitos T reconocen el antígeno mediante el receptor T (TCR), cuando éste es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (CPA) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las MHC son glucoproteínas presentes en las membranas celulares, éstas pueden ser de dos tipos: clase I y clase II; las clase I se encuentran en todas las células nucleadas, mientras que las clase II están exclusivamente en las CPA. Estas moléculas tienen la función de presentar el antígeno a los linfocitos T, así como participar en el proceso de maduración de los linfocitos en el timo. Los linfocitos B reconocen a los antígenos en su forma nativa, es decir sin necesidad de que sean procesados. (Tizard I, 2000)

Los linfocitos Th CD4<sup>+</sup> se activan cuando, a través de su receptor, reconocen determinantes antigénicos de los microorganismos, procesados por vía exógena y acoplados a moléculas de histocompatibilidad clase II (MHC II) en la membrana de la célula presentadora de antígeno. La función de los linfocitos Th es la secreción de diversas proteínas denominadas genéricamente citocinas, que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. (Erf GF, 2004).

Los LTh pueden dividirse en dos tipos con base en las citocinas que producen y, por consiguiente, según las principales funciones que promueven. El LTh 1 genera Interleucina 2, Factor de necrosis tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) e Interferón  $\gamma$  las cuales se desarrollan preferentemente con la presencia de patógenos

intracelulares; activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular mediada por células. (Abbas AK, 2004)

El LTh 2 produce Interleucina 4, Interleucina 5 e Interleucina 10, las cuales son responsables de una respuesta mediada por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago; este tipo de respuesta predomina durante la presencia de patógenos extracelulares y alérgenos. Ambas subpoblaciones secretan factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Estas son sólo algunas de las muchas citocinas producidas por las células del sistema inmunitario. (Abbas AK, 2004)

La inmunidad humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B, con la cooperación de los LTh2; esta respuesta es efectiva contra patógenos extracelulares y sus productos, ya que la inmunoglobulina puede unirse a sus estructuras y controlar la infección a través de diversos mecanismos, como la neutralización, la opsonización, la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o favoreciendo la liberación de histamina en la células cebadas, según el tipo de inmunoglobulina que esté participando. Estas inmunoglobulinas se clasifican como IgM, IgG (IgY en aves), IgA (Sharmas MJ, 1991) e IgE (en mamíferos).

La respuesta inmune celular (RIC) tiene una función importante contra la aparición y desarrollo de células tumorales, microorganismos como los virus, ciertas bacterias y algunos parásitos que sobreviven dentro de las células; la

RIC puede ocasionar la lisis de las células infectadas o la destrucción intracelular del microorganismo.

La RIC está mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos (LTc) y linfocitos (LTh1). Los linfocitos Tc CD8<sup>+</sup> se activan cuando reconocen epítomos procesados por vía endógena, acoplados a las moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC I) en la membrana de células blanco; las cuales son generalmente células infectadas por microorganismos (virus) o células malignas (Rojas EO, 2001) y su mecanismo de acción es destruirlas mediante apoptosis.

## **Citocinas**

Las citocinas son moléculas activas, liberadas por células específicas que despiertan una respuesta particular de otras células sobre las que actúan. Las citocinas tienen efectos múltiples por sí mismas que varían entre diferentes células blanco. También hay interacciones complejas entre diversas citocinas que dependen de las moléculas actuantes y el estado de diferenciación de las células que responden. (Tizard I, 2000)

Las principales funciones de las citocinas son: activación, proliferación y diferenciación de linfocitos, hematopoyesis y la movilización de leucocitos hacia los sitios de infección o lesión tisular en la inflamación. En las aves suceden estas funciones aún cuando los mecanismos por los que se realizan no están

claros. Se han utilizado diferentes citocinas de aves como estimulantes de una respuesta inflamatoria en pollos jóvenes, teniendo como resultado una resistencia a infecciones por algunos géneros de microorganismos intracelulares (Kogut *et al*, 1996).

En el caso de las citocinas aviares, la identificación se ha basado principalmente en la detección de actividades biológicas y funcionales, empleando ensayos *in vitro* y en la comparación de éstas con sus equivalentes en mamíferos (Lillehoj L, 1991; Lillehoj L, 2001). En las aves han sido caracterizadas a nivel molecular las siguientes citocinas: Interferón tipo I (Seckelick MJ, 1994) y II (IFN $\gamma$ ) (Kaiser P, 1998), Factor de crecimiento mielomonocítico (MGF) (Sterneck E, 1992), Factor transformante del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Jakowlew SB, 1992), Interleucina I- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) (Weining KC, 1998), Interleucina 2 (IL 2) (Kaiser P, 1992), Interleucina 4 (IL 4) (Avery S, 2004), Interleucina-6 (IL 6), Interleucina 8 (IL 8) (Barker KA, 1993), Interleucina 10 (IL 10) (Rothwell L, 2004), Interleucina 12 (IL 12) (Dagen WB, 2002), Interleucina 15 (Lillehoj L, 2001) e Interleucina 18 (IL 18) (Kaiser P, 2003; Gobel TW, 2003).

El IFN $\gamma$  en condiciones naturales es sintetizado y segregado como respuesta a una infección viral, bacteriana o parasitaria, siendo de gran importancia en infecciones con virus ARN de doble cadena. El peso de esta glucoproteína se encuentra entre 15 y 35 KDa (Gandhi *et al*, 1970), tiene función inmunorreguladora, activa macrófagos e incrementa su capacidad para

producir metabolitos reactivos intermediarios del oxígeno (Ovington et al, 1995).

Otra citocina importante en la respuesta celular es la IL 2; ésta tiene como función la expansión clonal de los linfocitos T tras el reconocimiento antigénico; también interviene en la proliferación de células NK y linfocitos B. La producción de IL 2 es transitoria con una secreción máxima alrededor de 8-12 horas después de la activación, tiene un peso aproximado de 14-17 KDa en mamíferos y en aves de 15.5 KDa ( Abbas AK 2004; Sharmas MJ, 1991).

## **Factor de Transferencia**

En 1942 Landstainer y Chase citaron por primera vez la transferencia de la respuesta inmune celular (RIC) por parte de un donador inmune a uno no inmune, utilizando para ello células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a tuberculina o cloruro de picrilo, dando como resultado que las células de los animales sensibilizados eran transferidas a los receptores no sensibilizados y estos adquirirían la capacidad de expresar la RIC de los donadores (Landstainer K & Chase 1942).

En 1949 Lawrence demostró que la RIC era transferible en humanos al utilizar linfocitos viables intactos de un individuo normal con una intradermorreacción (i.d.) positiva a la tuberculina e inyectarlos a un individuo con una i.d. negativa a la tuberculina, provocando que este último presentara una respuesta i.d.

positiva al mismo antígeno (Lawrence HS, 1949). En 1955 Lawrence y col. demostraron que la hipersensibilidad cutánea tardía podía ser transferida utilizando extractos solubles de leucocitos provenientes de 20 ml de sangre total; al componente activo de estos extractos celulares se le llamó “factor de transferencia” (FT).

En 1955 se dio a conocer que el FT podía pasar a través de una membrana de diálisis con un corte molecular menor a 20 KDa sin perder su capacidad biológica, esto eliminaba la posibilidad de que el efecto fuese causado por anticuerpos (Lawrence HS, 1955). Lawrence creyó que estos dializados contenían sólo una especie molecular, hoy se sabe que en realidad son un conjunto de moléculas llamadas extractos dializables leucocitarios o DLE (*Dialyzable Leukocyte Extracts*). Los DLEs son lábiles al calor, pero muy estables al frío y pueden almacenarse por varios años a temperaturas entre -20°C y -70°C (Estrada-Parra S, 1983). En 1983 Wilson y Fudenberg demostraron que el FT producía dos efectos: uno antígeno dependiente y otro antígeno independiente, proponiendo que este último era inespecífico y mediado por componentes como: prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilos (Wilson GB, 1983).

Borvak y Mayer, demostraron que el FT contenía aminoácidos como: lisina, serina, glicina y ácido glutámico (Borvak J and Mayer V 1990).

El mecanismo por el cual el FT ejerce su efecto biológico no ha sido completamente establecido, los primeros estudios en humanos demostraron que inhibe la migración de macrófagos de una manera antígeno específica (Wilson GB, 1981), transfiere la RIC (Spitler LE, 1972), aumenta la proliferación y actividad de linfocitos T (Kirkpatrick CH, 1972), induce la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos y aumenta la resistencia a infecciones en inmunodeficiencias de carácter genético (Levin AS, 1975); estudios más recientes en ratones han demostrado que el FT induce la producción de citocinas como la IL2 y el IFN $\gamma$  (Alvarez-Thull L & Kirkpatrick CH, 1996; Fabre RA, 2004; Calzada NG, 2000). Diversos estudios han demostrado que el FT puede tener interespecificidad, por ejemplo el FT bovino se ha utilizado para transferencia de inmunidad en aves (Wilson GB, 1988) y el FT porcino se ha aplicado a un modelo de resistencia a *Listeria* en ratón (Karhumaki, 1998). El FT ha sido ampliamente utilizado en humanos en la protección y el control de enfermedades infecciosas virales (Padierna L, 1985; Pizza G, 1996; Steele RW, 1980), micobacterianas (Bullock WE 1972; Estrada-Parra S, 1983; Fabre RA, 2004) y parasitarias (Delgado O, 1981). En medicina veterinaria el FT ha sido utilizado en la prevención de algunas enfermedades en suinos (Calzada NG, 2000; Rojas BS, 1987; Torres MH, 1994), aves (Wilson GB 1988; Klesius PH, 1984) y bovinos (Mateos RA, 1992).

Un compromiso del médico veterinario es garantizar que el sector agropecuario sea una industria eficiente y productiva, capaz de satisfacer las demandas alimenticias del país. Dentro de los rubros que resultan importantes en las explotaciones pecuarias, está el uso de vacunas que permitan una adecuada

prevención de las enfermedades infecciosas y con ello reducir pérdidas económicas por la eliminación de animales durante su ciclo productivo. El empleo de inmunomoduladores que mejoren la respuesta inmune en la vacunación ha sido abordado desde diferentes enfoques, uno de ellos es el uso de citocinas que estimulen la activación de linfocitos para modular la RIC (Kogut M, 2002; Min W, 2001; Rabinovich NR, 1994), particularmente el IFN $\gamma$  se ha aplicado en la vacunación contra algunos agentes intracelulares (Kogut M, 2002; Yilma T, 1989); sin embargo, el costo y la disponibilidad de citocinas comerciales hacen difícil su utilización, por lo que se puede emplear al FT como un inmunomodulador.

### **Técnica de Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

La técnica se inicia con la transcripción del ARNm en ADN complementario (ADNc), esto se realiza mediante una enzima llamada transcriptasa reversa, que sintetiza el ADNc en dirección 5' a 3' después de que el oligo de T se alinea en su secuencia complementaria (poli A). Una vez formado el ADN de doble cadena, se desnaturaliza a alta temperatura, generalmente a 94°C, posteriormente con la enzima ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) se generan copias del fragmento específico de acuerdo a los iniciadores diseñados, con base en la secuencia de las citocinas. Esta reacción se repite por varios ciclos, generando copias del

fragmento específico; el fragmento amplificado se visualiza mediante una separación electroforética en un gel de agarosa.

## **JUSTIFICACIÓN**

En el presente trabajo se propone el empleo del Factor de Transferencia Aviar (FTA) como un inmunomodulador. Debido a que aun no se conocen ciertos aspectos inmunológicos cruciales del FTA, que son necesarios para comprender su mecanismo de acción y determinar sus efectos en la reacción inmunitaria, es necesario evaluar la expresión de dos citocinas importantes en la respuesta inmune celular, empleando células mononucleares obtenidas de gallinas domésticas.

## **HIPÓTESIS**

El Factor de Transferencia Aviar inducirá la expresión de IFN $\gamma$  e IL 2 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de gallinas domésticas.

## **OBJETIVO**

Determinar, mediante la técnica de RT-PCR, si el FTA induce la expresión del RNAm del IFN $\gamma$  e IL 2, en células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas; para establecer su posible papel como inmunomodulador.

### **Objetivos Particulares**

1. Establecer las condiciones óptimas de la técnica de RT-PCR mediante el empleo de RNAm de CMSP de gallinas domésticas, para determinar la expresión del RNAm de IFN $\gamma$  e IL 2.
2. Determinar con la técnica de RT-PCR, la expresión del RNAm de IFN $\gamma$  e IL2, en CMSP de gallinas domésticas estimuladas *in vitro* con tres diferentes mitógenos (Ionomicina, PMA y Concanavalina-A), para establecer cuál emplear como testigo positivo de ambas citocinas en el ensayo de inducción de citocinas de CMSP estimuladas con FTA.
3. Determinar, mediante una cinética, la expresión del RNAm para IFN $\gamma$  e IL2 obtenido de CMSP de gallinas domésticas, estimuladas *in vitro* con tres diferentes dosis de FTA.
4. Determinar, mediante la cuantificación de las densidades ópticas de los productos de PCR, la dosis de FTA capaz de inducir la expresión del RNAm para IFN $\gamma$  e IL2 en CMSP de gallinas domésticas.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

El trabajo se realizó en dos etapas: en la primera se hizo la obtención y cultivo de CMSP, estandarización de la técnica RT-PCR, selección del control positivo de mitógeno y determinación del tiempo de extracción para la estimulación con FTA. En la segunda etapa se midió la expresión de citocinas de CMSP estimuladas con FTA.

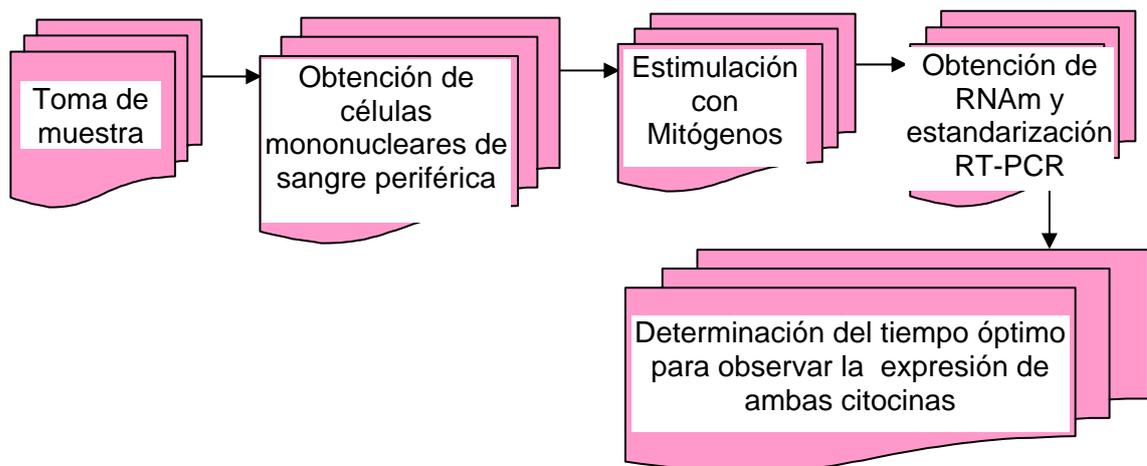
Para el estudio las gallinas fueron seleccionadas por muestreo sistemático, a partir de una población de gallinas alojadas en jaulas con dos o tres aves en cada una, siguiendo un orden de selección de acuerdo con el arreglo de las jaulas en la granja. Las gallinas designadas como elegibles por el muestreo quedaron incluidas en la muestra definitiva si eran de primer ciclo de postura, tenían un peso corporal de  $2 \pm 0.05$  kg, no mostraban ningún signo o patología a la inspección clínica, ni habían recibido tratamiento alguno por lo menos una semana previa a su selección.

La muestra definitiva estuvo formada por 3 gallinas de una población "Bovans White" del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Debido a que proceden de una línea genética, se considera que sus características genéticas y morfo-fisiológicas son homogéneas y no muestran variaciones, además que son suficientes para obtener las muestras de sangre necesarias para el ensayo que se realizó.

Las aves seleccionadas fueron alojadas en el Animalario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, sitio en el que permanecieron diez días como periodo de adaptación antes del inicio de la toma de muestras.

Las gallinas fueron mantenidas en una jaula de alambre de 90 x 41 x 65 cm; como dieta cada una recibió diariamente 160 gramos de alimento comercial balanceado<sup>1</sup>, que se colocó en un comedero de lámina de 50 x 10 x 6 cm y agua potable para bebida a libre acceso. Las condiciones de alojamiento fueron controladas para mantener la temperatura ambiental en  $18.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa 45.5%, ventilación continua, por medio de 2 extractores y se proporcionó un ciclo de iluminación 12 h: 12 h (L: O) por medio de 2 lámparas de luz blanca de 38 watts cada una.

Primera etapa: obtención y cultivo de CMSP, estandarización de la técnica RT-PCR, selección del control positivo de mitógeno y determinación del tiempo de extracción del RNAm para el ensayo con FTA, como se describe en la Figura 1.

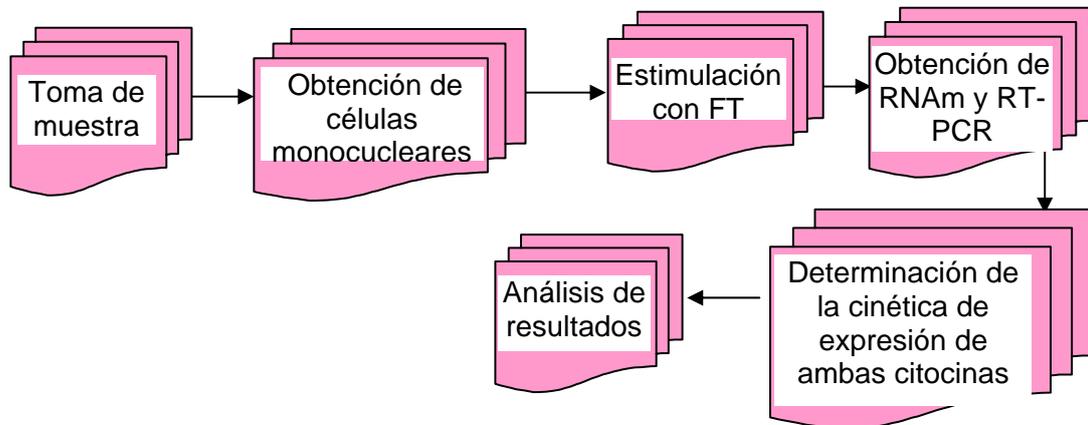


**Figura 1. Diagrama de flujo para la primera etapa del experimento**

---

1 Layin Purina®

Segunda etapa: Inducción de la expresión de citocinas de CMSP con FTA, (Figura 2).



**Figura 2. Diagrama de flujo de la segunda etapa del experimento**

## **Etapa de estandarización de las técnicas**

### **Obtención y cultivo de CMSP**

Se obtuvieron 10 ml de sangre de gallina a partir de la vena radial siguiendo la técnica descrita en el manual de UFAW (Poole BT, 1987), utilizando una jeringa S-Monovet® con anticoagulante (1.2-2 mg de EDTA). A partir de la muestra de sangre, se realizó el siguiente procedimiento:

- ❖ Las células fueron separadas en un gradiente de densidad  $1.077 \pm 0.001$  g/ml marca Lymphoprep®<sup>3</sup> de la siguiente manera: la sangre obtenida se diluyó 1:2 con solución salina isotónica de NaCl al 0.85% y ésta a su vez se agregó sobre la pared de un tubo cónico estéril con 8.5 ml de Lymphoprep®.
- ❖ Posteriormente se estratificó centrifugando a 800 G durante 25 min a 4°C.

- ❖ Una vez formadas las fases, se obtuvieron las células mononucleares localizadas en la interfase superior formada entre los glóbulos rojos y el plasma y se transfirieron a otro tubo estéril.
- ❖ El paquete celular se lavó con AIMV<sup>2</sup>.
- ❖ Se centrifugó a 250 G durante 10 minutos y se resuspendió en 1ml del mismo medio, para su posterior cuenta en azul tripano al 0.016% utilizando una cámara de Neubauer.

Las CMSP se cultivaron en una placa de cultivo de 24 pozos (4 series de 6 pozos). Para la estandarización de la prueba se usaron concentraciones de  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células en 1.0 ml de los diferentes medios utilizados. Posteriormente se estandarizaron las condiciones para la amplificación del gen constitutivo ( $\beta$ -actina), empleando la técnica de RT-PCR. Para la estandarización de la PCR para la amplificación del DNAC de IFN $\gamma$  e IL 2 se realizaron diferentes ensayos con distintas concentraciones de mitógenos: PMA (acetato-formol-miristato) 0.025 $\mu$ g, 0.25 $\mu$ g, 1 $\mu$ g y 2 $\mu$ g; PMA con Ionomicina 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l-1  $\mu$ g/ $\mu$ l, Concanavalina-A 5 $\mu$ g, 10 $\mu$ g y 20 $\mu$ g, así como un testigo sin mitógeno. Las células se lisaron con el producto comercial Trizol® a diferentes tiempos: 3h, 6h, 9h, 18h, 24h y 48h, para extraer el RNAm correspondiente.

---

2 Contiene L-glutamina, sulfato de estreptomina 50 $\mu$ g/ml y sulfato de gentamicina 10 $\mu$ g/ml. Número de Catalogo 31035025. GIBCO™

3 Sigma, St. Lois Missouri, MO, USA.

## Obtención de RNAm y RT-PCR

La extracción del RNAm de cada uno de los cultivos estimulados, se hizo de acuerdo al protocolo del producto comercial Trizol®<sup>4</sup>, con el siguiente procedimiento:

- ❖ Recolectar las células con el medio de cada pozo y centrifugarlas 0.8 G a 4°C durante 10 minutos. Decantar el medio y conservar el botón de células
- ❖ Resuspender las células adheridas a cada pozo con 500 µl de Trizol, y transferirlo al botón de células previamente centrifugadas. Dejar en reposo 5 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Agregar 5 ml de Glucógeno<sup>5</sup> y homogenizar.
- ❖ Agregar 110 ml de cloroformo<sup>6</sup> frío y homogenizar.
- ❖ Incubar 7 minutos en hielo.
- ❖ Centrifugar 15 minutos a 9300 G a 4 °C.
- ❖ Tomar sobrenadante (sin interfase).
- ❖ Agregar 260 ml de isopropanol<sup>7</sup> e invertirlo.
- ❖ Incubar 20 minutos en hielo.
- ❖ Centrifugar 15 minutos a 9300 G a 4 °C.
- ❖ Decantar sobrenadante.
- ❖ Lavar el botón con 500ml de etanol<sup>8</sup> al 80 % mediante inversión.
- ❖ Centrifugar 5 minutos a 3300 G a 4 °C.

---

<sup>4</sup> Invitrogen USA

<sup>5</sup> Roche®, 20 mg/ml

<sup>6</sup> Merck®

<sup>7</sup> Merck®

<sup>8</sup> Merck®

- ❖ Retirar todo el etanol.
- ❖ Secar el botón por 5 minutos en una campana de flujo laminar.
- ❖ Resuspender en 14  $\mu$ l de agua inyectable con ayuda de una micropipeta e incubando 5 minutos en baño maría a 45 °C.

El RNAm se cuantificó en un espectrofotómetro<sup>9</sup> para obtener una cantidad de 3  $\mu$ g de RNAm en 13  $\mu$ l de agua inyectable para la posterior transcripción inversa del RNAm.

### **Transcripción inversa del RNAmensajero (RNAm)**

El ADN complementario (ADNc) fue obtenido de la siguiente manera: a los 13 $\mu$ l de RNAm se les añadieron 2  $\mu$ l de la solución concentrada 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l de oligo (T)<sub>12-18</sub><sup>10</sup>, posteriormente se le incubó a 65°C/10 min, para favorecer la alineación del RNAm-poliA con el oligo dT. Después se incubó la reacción en hielo/5 min. para finalmente agregarle 15  $\mu$ l de la mezcla de reacción (cuadro 1). La reacción se efectuó en un volumen final de 30  $\mu$ l.

---

<sup>9</sup> Marca Eppendorf modelo 6131

<sup>10</sup> 5'-pd(T)<sub>12-18</sub> 3'. Amersham Biosciences®

| Reactivos                                  | Conc. final en la reacción |
|--|----------------------------|
| Agua-DEPC                                  |                            |
| 5X regulador para la 1 <sup>a</sup> cadena | 1X                         |
| 200 U/ $\mu$ l M-MLVRT <sup>11</sup>       | 160 U/ reacción            |
| 10 mM dNTP's                               | 400 $\mu$ M                |
| 100 mM DTT                                 | 10 mM                      |

### Cuadro 1. Mezcla de reacción para la transcripción inversa

Se continuó la reacción en el termociclador<sup>12</sup>, incubando a 37°C/1 hora y 95°C/5 min. Terminada la reacción, se centrifugó 5 segundos y se agregaron 20  $\mu$ l de agua inyectable para tener un volumen final de 50  $\mu$ l y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso.

### Reacción en cadena de la polimerasa.

En todos los ensayos se utilizaron 2.5  $\mu$ l del DNAc y 22.5  $\mu$ l de la mezcla de reacción para PCR con las condiciones adecuadas tanto para  $\beta$ -actina, IL 2 e IFN $\gamma$ , obteniendo un volumen final de 25  $\mu$ l y se corrieron en un termociclador<sup>6</sup> bajo diferentes condiciones. Los productos de PCR se sometieron a un corrimiento electroforético zonal en un gel de agarosa al 1% a 90 volts durante 45 minutos, se utilizó un marcador de peso (Kb plus y HAE III), se tiñeron con bromuro de etidio al 0.01% y se visualizaron en un analizador de imágenes<sup>13</sup>.

<sup>11</sup> M-MLV RT (Moloney- Murine Leucemia virus Reverse Transcriptase) Invitrogen <sup>TM</sup>

<sup>12</sup> Termociclador TECHNE modelo TC-312/FTC3102D

<sup>13</sup> Molecular Imaging Software 2005 Kodak V 4.0.2

## **β-ACTINA**

Los iniciadores empleados se diseñaron en el Laboratorio de Virología de FMVZ UNAM (Cuadro 5), y se utilizó la mezcla de reacción para PCR descrita en el Cuadro 2.

| <b>Reactivos</b>                    | <b>Conc. Final en la reacción</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Agua-DEPC                           |                                   |
| Regulador 10X PCR                   | 1X                                |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM             | 0.5 mM                            |
| dNTP's 10 mM                        | 200 μM                            |
| Primer 5' 20μM                      | 0.2 μM                            |
| Primer 3' 20μM                      | 0.2 μM                            |
| Taq polimerasa <sup>14</sup> 5 U/μl | 1 U/reacción                      |

**Cuadro 2. Mezcla de reacción para PCR β-actina**

Las condiciones de amplificación fueron:

|                          |                   |           |
|--------------------------|-------------------|-----------|
| <b>Desnaturalización</b> | 94°C/ 45 segundos | 30 ciclos |
| <b>Alineación</b>        | 60°C/ 45 segundos |           |
| <b>Extensión</b>         | 72°C/ 90 segundos |           |
| <b>Extensión final</b>   | 72°C/ 7 minutos   | 1 ciclo   |

## **IL 2**

Para la estandarización del ensayo de RT-PCR para IL 2, se probaron 3 diferentes iniciadores con distintas temperaturas de alineación y concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Los iniciadores que produjeron los mejores resultados fueron los empleados por Loza (Loza, 2003) (Cuadro 5), con algunas modificaciones descritas en el Cuadro 3.

<sup>14</sup> Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus* DNA polymerase gene) Invitrogen™

| <b>Reactivos</b>          | <b>Conc. final en la reacción</b> |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Agua-DEPC                 |                                   |
| Regulador 10X PCR         | 1X                                |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM   | 2.5 mM                            |
| dNTP's 10 mM              | 200 µM                            |
| Primer 5' 20µM            | 0.8 µM                            |
| Primer 3' 20µM            | 0.8 µM                            |
| Gelatina molecular 0.001% | 0.001%                            |
| Taq polimerasa 5 U/µl     | 1 U/reacción                      |

**Cuadro 3. Mezcla de reacción para PCR IL 2**

Las condiciones de amplificación fueron:

|                          |                     |           |
|--------------------------|---------------------|-----------|
|                          | 92°C x 75 segundos  | 1 ciclo   |
| <b>Desnaturalización</b> | 92° C x 45 segundos | 30 ciclos |
| <b>Alineación</b>        | 50°C x 60 segundos  |           |
| <b>Extensión</b>         | 72°C x 60 segundos  |           |
| <b>Extensión final</b>   | 72°C x 7 minutos    | 1 ciclo   |

## **IFN $\gamma$**

Después de varios ensayos para estandarizar el RT- PCR para esta citocina, se decidió emplear los iniciadores citados por Rothwell (Rothwell, 2004) (Cuadro 5), empleando las condiciones del Cuadro 4.

| <b>Reactivos</b>        | <b>Conc. final en la reacción</b> |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Agua-DEPC               |                                   |
| Regulador 10X PCR       | 1X                                |
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM | 2 mM                              |
| dNTP's 10 mM            | 200 µM                            |
| Primer 5' 20µM          | 0.2 µM                            |
| Primer 3' 20µM          | 0.2 µM                            |
| Taq polimerasa 5 U/µl   | 1 U/reacción                      |

**Cuadro 4. Mezcla de reacción para PCR IFN $\gamma$**

Las condiciones de amplificación fueron:

|                          |                    |           |
|--------------------------|--------------------|-----------|
|                          | 94° C/ 2 minutos   | 1 ciclo   |
| <b>Desnaturalización</b> | 94° C/ 45 segundos | 36 ciclos |
| <b>Alineación</b>        | 53° C/ 45 segundos |           |
| <b>Extensión</b>         | 72° C/ 90 segundos |           |
| <b>Extensión final</b>   | 72°C x 7 minutos   | 1 ciclo   |

|                                     |          |                                    |
|-------------------------------------|----------|------------------------------------|
| <b>β-ACTINA<br/>( 582 pb )</b>      | <b>F</b> | CCC TGA AGT ACC CCA TTG AAC ACG    |
|                                     | <b>R</b> | CCT CGG GGC ACC TGA ACC TCT        |
| <b>IL 2<br/>(469 pb)</b>            | <b>F</b> | AGT GTT ACC TGG GAG AAG T          |
|                                     | <b>R</b> | TTA CCG ACA AAG TGA GAA TC         |
| <b>IFN<sub>γ</sub><br/>(702 pb)</b> | <b>F</b> | GTG AAG AAG GTG AAA GAT ATC ATG GA |
|                                     | <b>R</b> | GCT TTG CGC TGG ATT CTCA           |

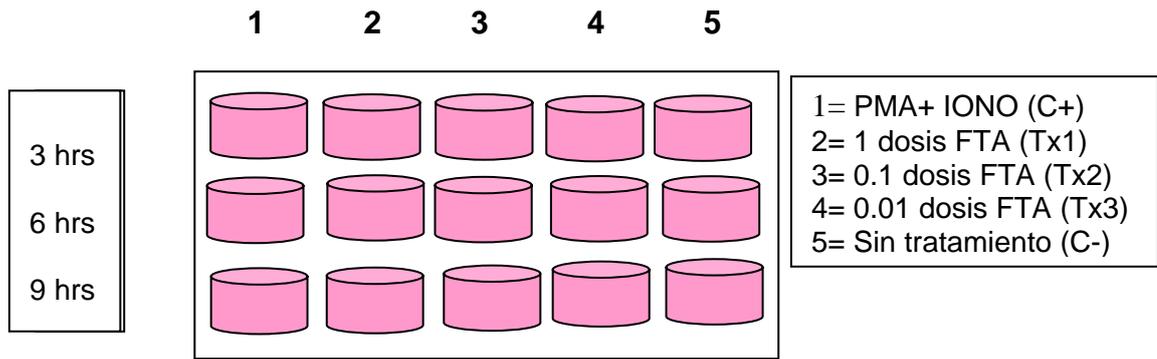
**Cuadro 5. Secuencia de los iniciadores utilizados en el experimento.**

## **Elaboración del FTA**

El FTA se elaboró a partir de 10 bazos de pollos machos de la línea Ross, clínicamente sanos, vacunados contra la enfermedad de Marek y de 30 días de edad. Los bazos fueron macerados con malla de aluminio y 30 ml de solución salina isotónica NaCl 0.85%; el macerado se sometió a 10 ciclos de congelación-descongelación y de dializó por centrifugación a 500 G en tubos Amicon® Ultra-15 (Millipore) con corte de 10 KDa. El dializado se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 micras y se alicuotó en tubos de 1 ml. Se tomó en cuenta que una dosis de FTA contiene aproximadamente  $4 \times 10^6$  células de bazo de pollo y equivale a  $7.3\mu\text{g}$  de proteína.

## **Inducción de la expresión de citocinas de CMSP con FTA.**

El experimento se realizó a partir de 10 ml de sangre de una gallina de la cual se separaron las CMSP con la técnica antes descrita y se cultivaron en una placa de cultivo de 24 pozos, utilizando 3 series de 5 pozos cada uno para un tratamiento y utilizando una concentración de  $3 \times 10^6$  células en 1 ml de medio AIMV. Teniendo elegidos los mitógenos a utilizar (PMA con Ionomicina  $0.025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ - $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); se realizó el experimento con las siguientes dosis de FTA: 1 dosis ( $7.3 \mu\text{g}$ ), 0.1 dosis ( $0.73 \mu\text{g}$ ) y 0.01 dosis ( $0.073 \mu\text{g}$ ) además de un Testigo (+) y un Testigo (-), colocándolos como se indica en la Figura 3.



**Figura 3. Esquema de los pozos del experimento de inducción de la expresión de citocinas de CMSP con FTA.**

El experimento se realizó por duplicado, así como la extracción del RNAm, obteniéndose un total de cuatro repeticiones para cada tiempo y tratamiento, para el análisis estadístico. A cada una de las muestras se le cuantificó el RNAm obtenido en un espectrofotómetro y se ajustó a 3 µg para hacer la transcripción inversa del RNAm.

Después de obtener el ADNc se realizó la técnica de PCR, siguiendo el protocolo descrito en la primera parte del trabajo. Los productos obtenidos se fueron colocados a un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%; y se determinó la densidad óptica de las bandas obtenidas empleando el programa Molecular Imaging Software 2005 Kodak V 4.0.2.

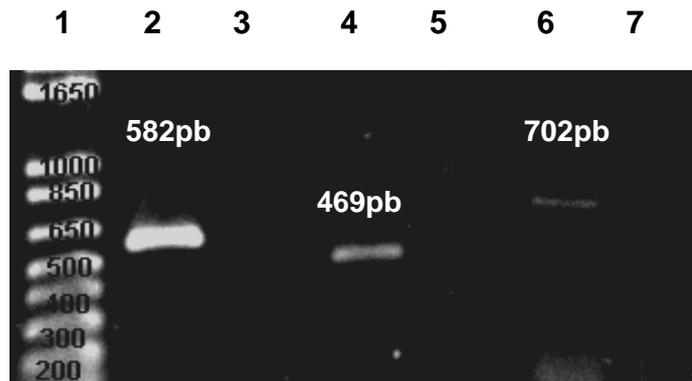
El cálculo de la expresión relativa (proporción) de IL 2 e IFN $\gamma$  se obtuvo dividiendo el valor de densidad óptica de cada citocina entre el valor de densidad óptica de la  $\beta$ -actina correspondiente.

## RESULTADOS

En el transcurso de este trabajo se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la detección de RNAm de células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas, tanto de la  $\beta$ -actina empleada como gen constitutivo, así como la de IL 2 e IFN $\gamma$ .

Primero se establecieron las condiciones óptimas para el cultivo celular, encontrándose que  $3 \times 10^6$  células por 1 ml de medio, permitían obtener cantidades suficientes de RNAm. Posteriormente se realizaron varios ensayos de proliferación celular empleando los diferentes mitógenos a distintos tiempos; una vez que se establecieron los mitógenos (PMA y Ionomicina) y los tiempos en que se indujo una mayor proliferación celular, se procedió hacer los cultivos celulares para obtener el RNAm y establecer las condiciones óptimas para el RT-PCR de ambas citocinas; para ello fue necesario realizar varios ensayos de PCR empleando diferentes iniciadores, concentraciones de  $MgCl_2$  y temperaturas. Las condiciones óptimas para la amplificación de ambas citocinas, son las que se describen en la sección de material y métodos.

En la figura 5, se muestran las bandas correspondientes a  $\beta$ -actina, IL2 e IFN $\gamma$  indicando sus pesos moleculares.



**Figura 5. Productos de PCR obtenidos utilizando los tres diferentes iniciadores. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: producto obtenido con los iniciadores de  $\beta$ -actina, Carril 3: testigo negativo para  $\beta$ -actina, Carril 4: producto obtenido con los iniciadores de IL 2, Carril 5: testigo negativo para IL2, Carril 6: producto obtenido con los iniciadores de  $IFN\gamma$ , Carril 7: testigo negativo para  $IFN\gamma$**

Los resultados obtenidos en la segunda etapa del experimento consistieron en la expresión de dos citocinas, medida como densidad óptica (DO), y fueron sometidos de manera independiente para cada citocina a análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado (5 x 3), balanceado, de dos factores: tratamiento, tiempo, con interacción simple y cuatro repeticiones cuyo modelo correspondiente es:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Donde:}$$

$\mu$ : Promedio general.

$\alpha_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$ : C+, C-, Tx1, Tx2, Tx3).

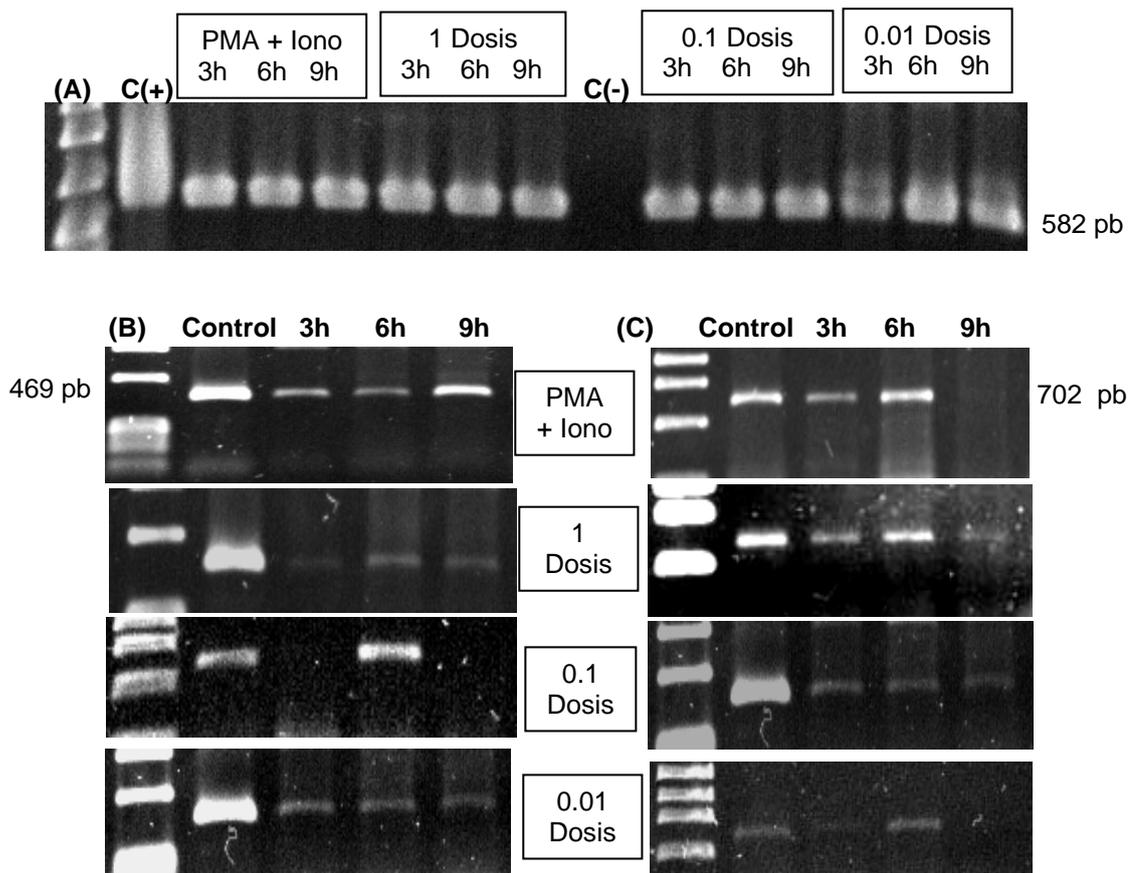
$\beta_j$ : Efecto del  $j$ -ésimo tiempo de expresión de la citocina ( $j$ : hora3, hora6, hora9).

$\alpha\beta_{ij}$ : Efecto de la interacción tratamiento x tiempo de expresión.

$\varepsilon_{ijk}$ : Error aleatorio asociado a cada ( $k$ -ésima) observación:  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$ .

Los tratamientos consistieron en: a) un testigo positivo, C+: PMA + Ionomicina; b) Tx1: FTA 7.3  $\mu\text{g}$ ; c) Tx2: FTA 0.73  $\mu\text{g}$ ; d) Tx3: FTA 0.073  $\mu\text{g}$  y e) un testigo negativo, C-: sin FTA. El segundo factor del diseño fue el tiempo de expresión de la citocina: 3, 6 y 9 horas. El análisis estadístico se realizó con los promedios de mínimos cuadrados (PMC) con nivel  $\alpha=0.05$  como criterio de significación estadística.

En la Figura 6 se muestran ejemplos representativos de los productos de PCR obtenidos con los diferentes tratamientos de FTA, a las distintas horas de extracción.



**Figura 6.** Ejemplos representativos de los productos de PCR obtenidos con los diferentes tratamientos (PMA+ Iono, 1 dosis, 0.1 dosis y 0.01 dosis), a las distintas horas (3, 6 y 9 horas) de extracción y sometidos a un corrimiento electroforético en geles de agarosa 1%. (A)  $\beta$ -Actina: marcador de peso, control positivo, 3, 6 y 9 horas, de los cuatro tratamientos (B) IL 2: marcador de peso, control positivo, 3, 6 y 9 horas (C) IFN  $\gamma$  : marcador de peso, control positivo, 3, 6 y 9 horas

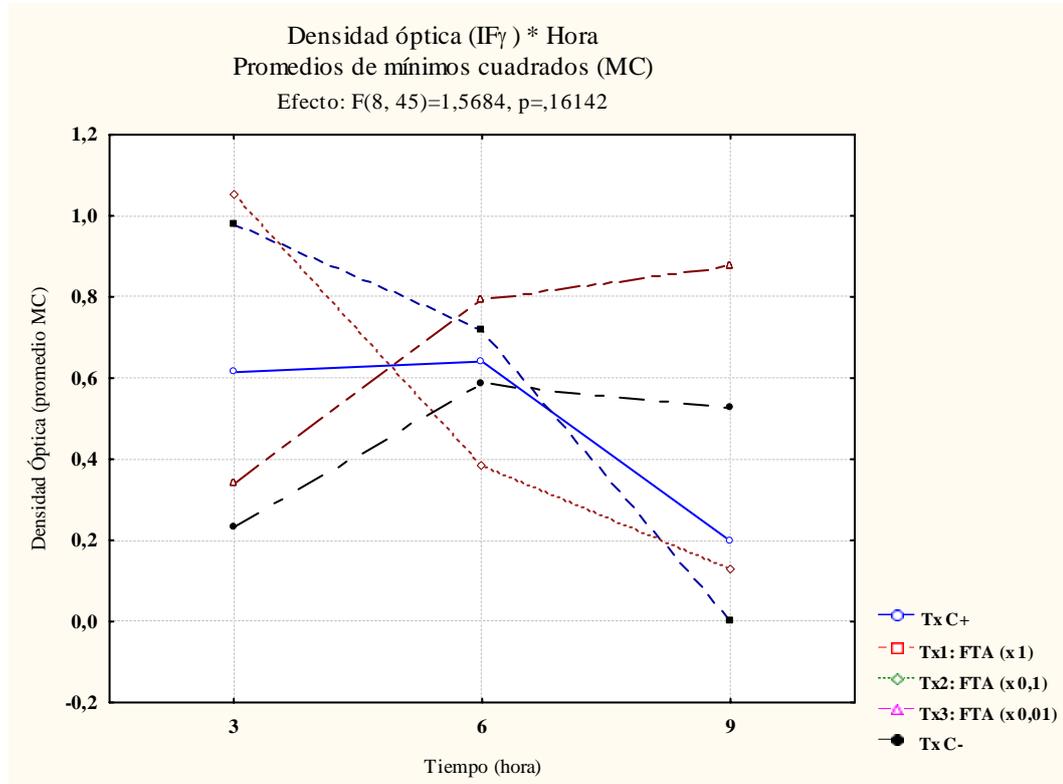
El cuadro 7 muestra la estadística descriptiva (tamaño de muestra (n), promedio y desviación estándar) de la expresión de cada citocina (DO) como respuesta a la exposición de las CMSP de gallinas domésticas a los cinco tratamientos a las 3, 6 y 9 horas.

|               |         | Citosina     |          |       |     |          |       |         |          |       |
|---------------|---------|--------------|----------|-------|-----|----------|-------|---------|----------|-------|
|               |         | IFN $\gamma$ |          |       | IL2 |          |       | General |          |       |
| H             | Tx      | n            | Promedio | S     | n   | Promedio | s     | N       | Promedio | S     |
| 3             | General | 20           | 0,596    | 0,642 | 20  | 0,570    | 0,561 | 40      | 0,583    | 0,595 |
|               | C-      | 4            | 0        | 0     | 4   | 0        | 0     | 8       | 0        | 0     |
|               | C+      | 4            | 0,614    | 1,001 | 4   | 0,923    | 0,878 | 8       | 0,768    | 0,887 |
|               | Tx1     | 4            | 0,977    | 0,342 | 4   | 0,462    | 0,393 | 8       | 0,720    | 0,438 |
|               | Tx2     | 4            | 1,052    | 0,535 | 4   | 0,782    | 0,610 | 8       | 0,917    | 0,550 |
|               | Tx3     | 4            | 0,338    | 0,410 | 4   | 0,681    | 0,080 | 8       | 0,509    | 0,329 |
| 6             | General | 20           | 0,507    | 0,646 | 20  | 0,680    | 0,527 | 40      | 0,594    | 0,588 |
|               | C-      | 4            | 0        | 0     | 4   | 0        | 0     | 8       | 0        | 0     |
|               | C+      | 4            | 0,640    | 1,017 | 4   | 1,076    | 0,574 | 8       | 0,858    | 0,799 |
|               | Tx1     | 4            | 0,719    | 0,303 | 4   | 0,831    | 0,376 | 8       | 0,775    | 0,321 |
|               | Tx2     | 4            | 0,384    | 0,450 | 4   | 0,798    | 0,636 | 8       | 0,591    | 0,556 |
|               | Tx3     | 4            | 0,792    | 0,873 | 4   | 0,695    | 0,087 | 8       | 0,744    | 0,577 |
| 9             | General | 20           | 0,240    | 0,519 | 20  | 0,562    | 0,426 | 40      | 0,401    | 0,496 |
|               | C-      | 4            | 0        | 0     | 4   | 0        | 0     | 8       | 0        | 0     |
|               | C+      | 4            | 0,198    | 0,161 | 4   | 0,579    | 0,095 | 8       | 0,388    | 0,238 |
|               | Tx1     | 4            | 0        | 0     | 4   | 0,524    | 0,462 | 8       | 0,262    | 0,412 |
|               | Tx2     | 4            | 0,129    | 0,259 | 4   | 1,035    | 0,419 | 8       | 0,582    | 0,582 |
|               | Tx3     | 4            | 0,876    | 0,950 | 4   | 0,670    | 0,121 | 8       | 0,773    | 0,636 |
| Total general |         | 80           | 0,494    | 0,626 | 80  | 0,591    | 0,501 | 160     | 0,542    | 0,567 |

**Cuadro 7. Estadística descriptiva de la expresión de dos citocinas en CMSP de gallinas domésticas por la exposición a FTA en 3,6 y 9 horas. n: tamaño del grupo (muestra), s: desviación estándar, H: hora, Tx: tratamiento, C: Controles.**

## IFN $\gamma$

La Figura 7 muestra el comportamiento de la expresión del IFN $\gamma$ .



**Figura 7. Densidad óptica de la expresión de IFN $\gamma$  por tratamiento por hora.**

El análisis de resultados del tratamiento Tx1 mostró diferencia significativa entre los promedios de DO en las distintas horas de observación ( $F_{2,9} = 14.748$ ;  $P = 0.0014$ ). Cada promedio, tanto a las 3 (0.9776) como a las 6 horas (0.7198) fue significativamente mayor que a las 9 horas (0.0000) respectivamente ( $t = -2.386$ ;  $P = 0.0213$ ); sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los promedios a las 3 y las 6 horas de expresión ( $t = -0.629$ ;  $P = 0.5324$ ).

Para el Tx2 se observó una respuesta similar al Tx1 ( $F_{2,9} = 4.8915$ ;  $P = 0.0365$ ), ya que tanto el promedio de DO a las 3 (1.05224) como a las 6 horas (0.38411) fueron, cada uno, significativamente mayores que a las 9 horas

(0.12967) respectivamente ( $t = -2.251$ ;  $P = 0.0293$ ); y entre las 3 y las 6 horas no se encontró diferencia significativa ( $t = -1.631$ ;  $P = 0.11$ ).

## IL 2

Entre los promedios de DO de IL 2 de los Tx1, Tx2 y Tx3 no se encontró diferencia significativa a ninguna de las horas de expresión del estudio ( $F_{4,27} = 0.5387$ ;  $P = 0.7086$ ) (Figura 8) mientras que, a las 3 horas, se encontró que el promedio del C+ (0.9232) fue significativamente mayor que el del C- (0.3093) ( $t = -1.96$ ;  $P = 0.0562$ ), observándose esta misma relación de diferencia entre estos tratamientos a las 6 horas de expresión (C+: 1.0768 vs. C-: 0.2000) respectivamente ( $t = -2.799$ ;  $P = 0.0075$ ).

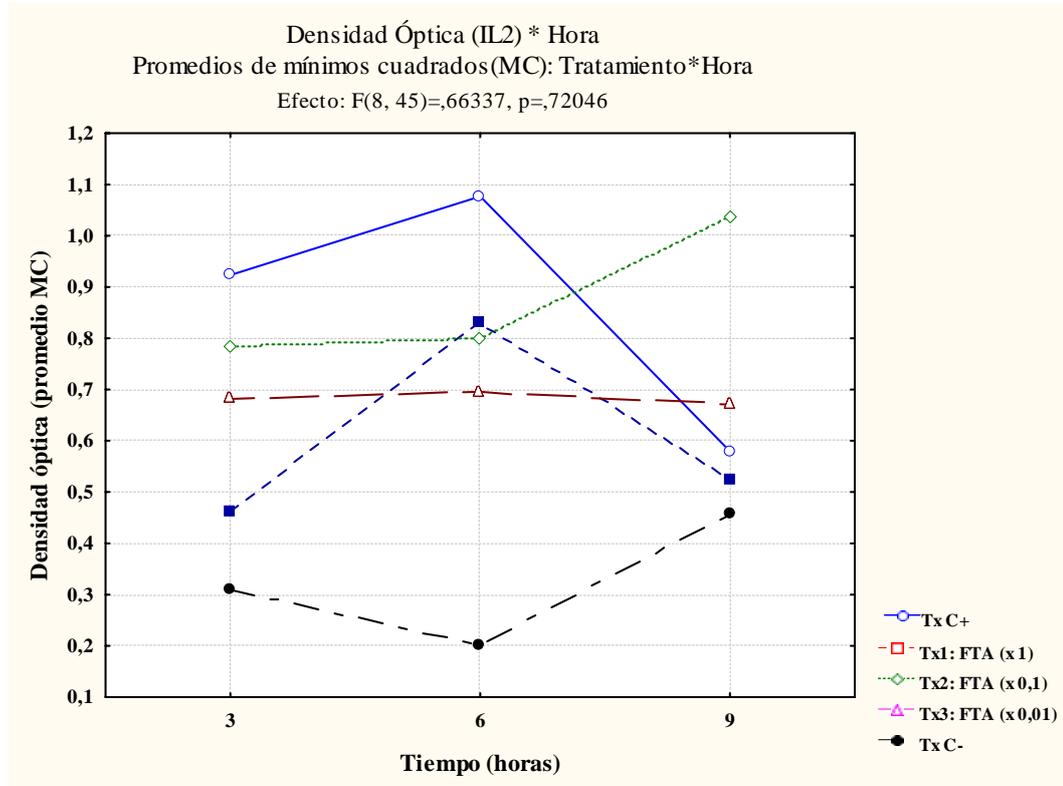


Figura 8. Densidad óptica de la expresión de IL 2 por tratamiento por hora.

## DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el Factor de Transferencia Aviar tenía un efecto sobre la producción del RNAm de IFN $\gamma$  e IL 2, en cultivos de células mononucleares de sangre periférica gallinas domésticas; para ello fue necesario establecer las condiciones, tanto del cultivo celular, como de la técnica de RT-PCR; debido a que estas técnicas no estaban estandarizadas en el laboratorio.

Para estandarizar las condiciones óptimas para el cultivo de CMSP se realizaron varios ensayos, probando diferentes concentraciones ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células/ml); observándose, que el número de células es crítico para obtener una cantidad óptima de RNAm, ya que al utilizar concentraciones menores a  $3 \times 10^6$  células por ml, la eficiencia de extracción disminuía. Dentro de la literatura existen reportes muy variados en cuanto a la concentración de células que debe emplearse para dichos cultivos; por ejemplo Rothwell y Okamura utilizaron una concentración de  $5 \times 10^6$  células de bazo por ml de medio (Rothwell L, 2004; Okamura M, 2004), Neelima menciona la misma concentración pero utilizó células mononucleares de sangre periférica (Neelima S, 2003); Sundaresan maneja la concentración de  $2 \times 10^6$  células mononucleares (Sundaresan NR, 2005), mientras que Loza trabajó con una concentración de  $1 \times 10^7$  de células/ml (Loza RE, 2003).

Una vez establecida la concentración celular que nos permitió extraer RNAm total suficiente, se determinaron las concentraciones óptimas de mitógenos para establecer cuál de ellas podía ser empleado para generar un testigo positivo para amplificar la secuencia genómica de cada citocina. Los datos publicados para la activación de linfocitos de aves, mencionan diversas concentraciones de mitógenos: 1.2, 5, 10 y 12.5  $\mu\text{g}$  de Con-A (Rothwell L, 2004; Okamura M, 2004; Loza RE, 2003; Neelima S, 2003; Gogal RM, 2004), 10, 20, 12.5  $\mu\text{g}$  PHA (Neelima S, 2003; Rothwell L, 2004), 2.0 ng PMA y 40 ng Ionomicina (Okamura M, 2004) y en este estudio se encontró que los mitógenos que produjeron una mejor respuesta fueron PMA con Ionomicina (0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Debido a que en el laboratorio no se contaba con un testigo positivo para ninguna citocina; para poder establecer qué mitógeno emplear como testigo positivo, fue necesario establecer simultáneamente, las condiciones que amplificaran las bandas correspondientes para ambas citocinas. Para esto se hizo una cinética en la que se estimularon las células con PMA y Ionomicina y se obtuvo el RNAm a distintos tiempos (3, 6, 9, 12 y 24 horas), posteriormente se sintetizaron los DNAc y cada uno de ellos se sometió a PCR con los pares de iniciadores correspondientes, empleando diferentes concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , hasta visualizar las bandas esperadas. Los iniciadores que mejor funcionaron fueron para la IL 2 el citado por Loza (Loza RE, 2003) y para IFN $\gamma$  el de Rothwell (Rothwell L, 2004); con algunas modificaciones.

Otro parámetro que se estandarizó fue el tiempo de incubación que inducía la mayor expresión tanto de IL 2 como de IFN  $\gamma$ , en otros trabajos utilizaron intervalos que fueron desde 0.5 a 6 horas de acuerdo con Sundaresan (2005), hasta 48 horas según describe Okamura (2004). Para nuestros ensayos se decidió emplear un intervalo de 3, 6 y 9 horas.

Una vez estandarizadas las condiciones que nos permitieron contar con los testigos positivos para ambas citocinas, se procedió a hacer los ensayos con el FTA, con la finalidad de establecer el efecto de éste sobre las células del sistema inmune, particularmente las CMSP. En el presente estudio solamente se encontró que la máxima expresión de IFN  $\gamma$  ocurrió en Tx1 (1 dosis) y Tx2 (0.1 dosis) a las 3 horas, declinando significativamente hacia las 9 horas; mientras que, la expresión de IL 2 fue mayor con el Tx2 (0.1 dosis) y el C (+) respecto al C (-), independientemente de la hora de observación. Por otra parte los tratamientos aplicados no indujeron diferencialmente la expresión de IL 2 entre las 3 y las 9 horas; mientras que, tanto a las 3 como a las 6 horas, la expresión de IL 2 fue mayor para el C (+), que para el C (-).

Como podemos observar en la Figura 7, la máxima expresión de IFN $\gamma$ , se obtuvo a las 3 horas, en las células estimuladas con 0.1 dosis de FTA (Tx2) y 1 dosis de FTA (Tx1), siendo su expresión, mayor que el testigo positivo. La expresión de esta citocina, tanto para 1 dosis como para 0.1 dosis, disminuyó en el tiempo, dejándose de expresar a las 9 horas, lo que sugiere que a la expresión del RNAm empleando estas dosis de FTA, se da en un corto tiempo;

estos resultados coinciden con los reportados por Valderrábano (Valderrábano OE, 2005), en donde se encontró que cultivos de esplenocitos de ratón estimulados con extractos dializables leucocitarios (*DLE*) murinos, indujeron una alta expresión del RNAm de IFN  $\gamma$  desde las dos horas de cultivo, siendo nula su expresión a las 8 horas. Para el Tx3 (0.01 dosis), se observa una cinética muy semejante a la del testigo negativo; aún cuando a las 9 horas se observa un mayor nivel de expresión, habría que hacer la medición a las 12 horas post- estimulación, para determinar si mostrará la misma tendencia que el testigo negativo.

Como se muestra en la Figura 8, la máxima expresión de IL 2 se obtuvo a las 6 horas en las células estimuladas con mitógeno; para este mismo tiempo podemos observar que las tres dosis de FTA, indujeron la expresión de esta citocina aunque por debajo del testigo positivo; sin embargo a las 9 horas, las células estimuladas con 0.1 dosis de FTA (Tx2), mostraron valores de expresión mayores que el testigo positivo (semejantes a los alcanzados por el mitógeno a las 6 horas); si se observa la cinética en la expresión, la gráfica sugiere que la dosis mas alta de FTA induce la expresión de IL 2 en menor tiempo (6 horas), mientras que la dosis intermedia lo hace hasta las nueve horas, alcanzando niveles de expresión por encima del testigo positivo; por su parte la dosis menor parece mantener una baja expresión de esta citocina en todos los tiempos observados. Debido a que la IL 2 se produce tras la activación de LTh, es posible suponer que nuestros resultados podrían concordar con lo reportado por De la Fuente (De La Fuente GM, 2006), que observó que el *DLE* humano induce la proliferación de linfocitos Th CD4+,

cultivados *in vitro*. Para demostrar si efectivamente el FTA estimula la producción de IL2, se están realizando ensayos de linfoproliferación, empleando MTT, según el protocolo descrito por Neelima (Neelima S, 2003).

Para demostrar un posible efecto del FTA sobre las CMSP, se podrían hacer otros ensayos; uno de ellos sería hacer un ensayo de RT-PCR en tiempo real para poder contar con datos exactos; desafortunadamente el experimento no se pudo realizar de esta manera por no contar con el equipo necesario. Otra alternativa sería determinar los niveles de ambas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos; sin embargo hasta donde se pudo investigar, únicamente existen anticuerpos monoclonales para IFN  $\gamma$  aviar, lo que limitaría la cuantificación de IL 2.

Para estudios posteriores se sugiere hacer una separación de las diferentes poblaciones celulares a fin de tener un menor número de variables en el ensayo. En un estudio reciente se observó que el FT humano tiene ligandos para TLR2 (Robledo AFH, 2006); en aves el TLR2 se expresa tanto en macrófagos como en heterófilos y se ha reportado, que la activación de estas células a través de TLR2 aumenta la vía oxidativa (He H, 2006; Kogut MH, 2005); sería interesante hacer ensayos para medir la posible activación de estas células por el FTA; ya sea midiendo óxido nítrico en macrófagos, o estallido respiratorio en heterófilos; estos ensayos tendrían la ventaja de utilizar métodos colorimétricos cuantitativos.

## **CONCLUSIONES**

- Se determinó la concentración de mitógenos y tiempos óptimos, para inducir la expresión de ambas citocinas y poder contar con testigos positivos durante el ensayo con el FTA.
- En el ensayo con FTA, se encontraron diferencias para IFN $\gamma$  en el Tx1 (1 dosis) y Tx2 (0.1 dosis), en sus distintas horas de observación. Para IL 2 no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

## **PROSPECTIVA**

En ensayos posteriores se sugiere utilizar 0.1 dosis de FTA como referencia.

Para tener una visión más amplia del posible efecto del FTA sobre CMSP, sería interesante el determinar la expresión de Interleucina 4 (IL 4) e IL 10, que corresponden a un perfil tipo TH2, para ver si ésta se modula negativamente; como se menciona en el trabajo realizado por Fabre (Fabre RA., 2004), donde se encontró una correlación entre el aumento de expresión de IL 2 e IFN $\gamma$  y la disminución de IL 4 en pulmones de animales tratados con DLE murino.

## LITERATURA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Celular and Molecular Immunology*. 5<sup>nd</sup> ed. Madrid España: Saunders Press, 2004.
2. Alvarez-Thull L & Kirkpatrick CH. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 1996; 9:55-59.
3. Avery S, Rothwell L, Degen WD, Schijns VE, Young J, Kaufman J, Kaiser P. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3,IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gen for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. *J Interferon Cytokine Res.* 2004; 24:600-10.
4. Barker KA, Hampe A, Stoeckle MY and Hanafusa H. Transformation-associated cytokine 9E3/CEF4 is chemotactic for chicken peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 1993; 67: 3528-33.
5. Borvak J, Mayer V and Kotuliak J. Semipurified human leukocyte ultrafiltrate in herpes zoster I. Large-scale preparation and biochemical analysis. *Acta Virol.* 1989; 33:417-427.
6. Borvak J, Mayer V and Moravek L. Amino acid analysis of selected reversed-phase high performance liquid chromatograph peaks of crude and partially purified lysed human leukocyte ultrafiltrate. *Acta Virol.* 1990; 33:417-427.
7. Bullock WE, Fields JP, Brandriss MW. An evaluation of transfer factor as immunotherapy for patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med.* 1972; 287:1053-1059.

8. Calzada NG. Uso en lechones de Factor de Transferencia y *Parapoxvirus* inactivado (*Baypamun*) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. (Tesis Grado Maestra en Ciencias con especialidad en Inmunología). México: IPN, 2000.
9. Dagen WG, Van Daal N, Van Zuilekom HI, Burnside J, Schijns VE. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *J Immunol.* 2004; 172:4371-80.
10. De La Fuente GM., Estrada GI., Estrada PS. y Pérez TSM. Análisis in vitro de subpoblaciones linfocitarias estimuladas con Extracto Dializable de Leucocitos (Transferon). Memorias del 1er Encuentro internacional sobre Factor de Transferencia "Sherwood Lawrence"; 2006 noviembre 24: México D.F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Pág. 17.
11. Delgado O, Romano EL, Belfort E, Pifano F, Scorza JV, Rojas Z. Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981; 19:351-359.
12. Erf GF. Cell-Mediated Immunity in Poultry. *Poult Sci.* 2004; 83:580-590.
13. Estrada-Parra S, Velasco-Castrejon O, Rébora F, Díaz ML, Padierna J. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* 1983; 25:589-599.
14. Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Range MJ, Estrada-García I. Hernández-Pando R, Estrada-Parra S. Transferí factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 215-223.

15. Gandhi SS, Burke DC, Scholtissek C. Virus RNA síntesis by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus and interferon production. *J gen Virol* 1970; 9:97-99.
16. Göbel TW, Schneider K, Schaerer B, Meiri I, Puehler F, Wigend S, Staeheli P, Kaspers B. IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ Tcells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J Immunol.* 2003; 171:1809-15.
17. Gogal RM Jr, Ahmed SA, Larsen CT. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (lympho-pro). *Avian Dis.* 1997; 41:714-25.
18. He H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH. Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Tol-like receptor agonists in chicken monocytes. *Mol Immunol.* 2006; 43:783-9.
19. Jakowlew SB, Cubert J, Danielpour D, Sporn MB, Roberts AB. Differential regulation of the expression of transforming growth factor<sup>2</sup> mRNAs by growth factors and retinoic acid in chicken embryo chondrocytes, myocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992; 150:377-385.
20. Kaiser P, Mariani P. Promotor sequence, axon: Intron structure and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T cell proliferative activity is IL 2 and not IL 15. *Inmunogenetics* 1992; 49:26-35.
21. Kaiser P, Wain HM, Rothwell L. Structure of the chicken interferon- $\gamma$  gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene* 1998; 207:25-32.
22. Kaiser P, Underwood G, and Davison F. Differential Cytokine Responses following Marek's Disease Virus Infection of Chickens Differing in Resistance to Marek's Disease, *J. Immunol.* 2003; 171: 1809-1815.

23. Karhumaki E, Marnela KM, Khron K Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocyte and porcine spleen dialysate. Int J Biochem. 1988; 20:1067-1072.
24. Kirkpatrick CH, Rich RR & Smith TK. Effects of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients. J Clin Inv. 1972; 51: 2948-58.
25. Kogut MH, Moyers RBm DeLoach JR. Las citocinas y sus interrelaciones funcionales: potenciación de la respuesta inflamatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en las aves. Memorias del Curso de Actualización Avances en Inmunología Aviar. México (DF) Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 1996:8-12.
26. Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P. Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. Dev Comp Immunol. 2002; 26: 817-830.
27. Kogut MH, Igbal M, He H, Philbin V, Kaiser P, Smith A. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. Dev Comp Immunol. 2005; 29:791-807.
28. Klesius PH, Giambrone JJ. Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. Poult Sci. 1984; 63:1333-7.
29. Landstainer K. & Chase MW. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. Proc Soc Exp Biol Med. 1942; 49: 688-690.
30. Lawrence HS. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. Proc Soc Exp Biol Med. 1949; 71: 516-519.

31. Lawrence HS. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest.* 1955; 34:219.
32. Levin AS, Byers VS, Fudenberg HH, Wybran J, Hackett AJ, Johnston JO & Spitles LE. Osteogenic sarcoma: immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor specific transfer factor. *J Clin Inv.* 1975; 55: 487-99.
33. Lillehoj HS. Lymphocytes involved in cell-mediated immune responses and methods to assess cell-mediated immunity. *Poult Sci.* 1991; 70: 1154-1164.
34. Lillehoj HS, Min W, Choi KD, Babu US, 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; 82:229-44.
35. Loza RE, Esquivel GF, Mercado SJ, Gutierrez XL, Banda RV, Verdugo RA. Expresión del ARNm de la IL-2 en bazo de pollos vacunados contra el virus de la Influenza Aviar. *Tec. Pecu. Méx.* 2003; 41:141-152.
36. Mateos RA. Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. *Vet. Mex.* 1992; 23:4-8.
37. Min W, Lillehoj HS, Burnside J, Weining KC, Staeneli P, Zhujj. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma, TGF-beta 4 and lymphotaction on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* 2001; 20: 267-274.
38. Neelima S, Ram GC, Kataria JM and TK Gaswami. Avian Reovirus Induces an Inhibitory Effect on Lymphoproliferation in chickens. *Vet Res Commun* 2003; 27: 73-85.

39. Okamura M. Cell mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN $\gamma$  production. *Comp. Immunol Microbiol Infec Dis* 2004; 27:255-72.
40. Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and Immunological control of *Eimeria* spp. *Int J Parasitol* 1995; 25:1331-1351.
41. Pastoret PP. *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press San Diego California USA 1998.
42. 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.
43. Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Gritti F, Rouse E, Fudenberg HH, De Vinci C, Viza D. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy*. 1996; 9:41-7.
44. Poole BT. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: 6<sup>a</sup> Edition*. Longman Scientific and Technical. England 1987 p 640-662.
45. Rabinovich NR; McInnes P, Klein D, Fentonlall B. Vaccine Technologies: View to the future. *Science* 1994:1401-1404.
46. Robledo AFH, Pérez TSM, Wong B., Isibasi AA., Estrada GI., Estrada PS. Estudio de la presencia de ligandos para TLR2 y TLR4 en el DEL humano (Transferon). *Memorias del 1er Encuentro internacional sobre Factor de Transferencia "Sherwood Lawrence"*; 2006 noviembre 24: México D.F. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

47. 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). México, DF. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1987.
48. Rojas EO. Inmunología (de memoria). 2ª Edición. México. Editorial Médica Panamericana. 2001
49. 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;173:2675-82
50. Seckellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis. J. Interferon Res 1994; 14:71-79.
51. Sharmas MJ. Avian Cellular Immunology. CRC Press. Boston 1991.
52. Spitler LE, Levin AS, Stites DP, Fudenberg HH, Pirofsky B, August CS, Stiehm ER, Hitzig WH & Gatti RA. The Wiskott-Aldrich syndrome: results of transfer factor therapy. J Clin Inv. 1972; 51: 3216-24.
53. Steele RW, Myers MG, Vincent MM. Transfer factor for the prevention of varicella-zoster infection in childhood leukemia. N Engl J Med 1980; 303:355-9.
54. 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.
55. Sundaresan NR, Ahmed KA, Saxena VK, Sastry KV, Saxena M, Pramod AB, Nath M, Singh KB, Rasool TJ, DevRoy AK, Singh RV. Differential expression of inducible nitric oxide synthase and cytokine mRNA in chicken

- lines divergent for cutaneous hypersensitivity response. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108:373-85.
56. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 6ª Edición. Interamericana McGraw-Hill. México 2000. p 89.
57. Valderrabano OE. Establecimiento de un modelo *in vitro* para analizar el efecto biológico del extracto dializable de bazo murino sobre macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de maestría). México, D.F. ENCB. IPN 2005.
58. 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.
59. Wilson GB. & Fudenberg HH. Leukocyte migration inhibition as a method for assaying transfer factor activities. *Lymphokines Res.* 1981; 4: 107-73.
60. Wilson GB. & Fudenberg HH. Is controversy about transfer factor therapy nearing an end? *Immunol Today.* 1983; 4: 157-161.
61. 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.
62. Yilma T, Owens S, Fennie EH, Anderson KP. Enhancement of primary and secondary immune responses by interferon-gamma. *Adv Med Exp Biol.* 1989; 251:145-152.
63. Zavaleta LA. Estudio inmunológico de los niveles de linfocitos en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 y Tuberculosis Renal, sometidos a tratamiento con Factor de Transferencia. (Tesis licenciatura). México, DF. ENCB. IPN. 2002.