

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

***EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL FACTOR
DE TRANSFERENCIA EN POLLOS INMUNIZADAS CONTRA
INFLUENZA AVIAR***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

RODRIGO ERNESTO TÉLLEZ NÚÑEZ

Asesores:

Dra. Laura Cobos Marín

MPA. Frida Salmerón Sosa



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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.

AGRADECIMIENTO

Proyecto financiado a través de Programa de Apoyo de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIIT IN226005).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por estar siempre conmigo, tanto en las buenas como en las malas. Gracias mamá.

A Laura Cobos, por ser el mejor ejemplo que he tenido.

A Frida Salmerón, por el apoyo que me dio.

A Myrna Vicencio y María José por ser como de mi familia.

A Gris, José Luis, Cristy, Esther, Martín por ser los primeros en enseñarme como estar en un laboratorio.

A Silvia Buntinx, Rodrigo, Marce, Gabriel, Ceci, Magda, Caty, Rubí, por confiar en mí y apoyarme.

A las personas del Departamento de Microbiología e Inmunología, Lupita, Rosalba, Dr. Daniel Martínez, Dr. Antonio Verdugo, Dr. Alejandro de la Peña, Dr. José Ángel Gutiérrez, Dra. Fabiola, Dra. Alejandra, Dr. Francisco Basurto, Lorena, Mauricio, Luary.

A mis compañeros de Virología, Sr. Mario, Alejandra, Armando, José Manuel, Rebeca, Rosalba, Francisco, Dr. Iturbe, por compartir el tiempo de trabajo.

A mis sinodales, por que esté trabajo no se hubiera terminado sin su ayuda.

A Alberto Bravo por su ayuda en este trabajo y por considerarlo mi amigo.

A Victoria Contreras, por ser mi compañera, mi guía y caminar y volar junto a mí.

A mis honorarias, Luisa, Luz y Maricarmen, por ser quienes han querido aprender.

A mis alumnos, porque me han enseñado a ser más paciente y a estudiar más.

A mis amigos, del IDB, a los de la Fac, a Rocío y Karina 7 años juntos y lo que nos falta!

A todos mis profesores de la Facultad, gracias por enseñarme el camino.

A todas las personas que me han acompañado a lo largo de este viaje que llamo vida.

Para Fernando Meléndez Célis, mi avanzado.

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Factor de transferencia	2
El FT en Medicina Veterinaria	5
Inmunidad en aves	5
Influenza Aviar	7
Diagnóstico	8
Vacunación	9
Impacto Económico	10
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos Particulares	12
Material y Métodos	12
Animales	12
Inhibición de la Hemoaglutinación	14
ELISA	15
Obtención de ARNm y realización del RT-PCR	16
Determinación de la expresión de citocinas	17
Resultados	19
IH	20
ELISA	21

PCR	22
Discusión	23
Conclusiones	26
Referencias	27

ABREVIATURAS

ADN= Acido desoxirribonucleico

ADNc= Acido desoxirribonucleico complementario

APC= Células presentadoras de antígeno

ARN= Ácido ribonucleico

ARNm= Ácido ribonucleico mensajero

β actina= Beta actina

C= Control

dNTP's= deóxido nucleótidos trifosfato

DLE= Extracto leucocitario dializable

DO= Densidad óptica

DTT= Dithiothreitol

ELISA= Enzyme linked immunosorbent assay (Ensayo inmuno enzimático)

FT= Factor de Transferencia

FTa= Factor de Transferencia Aviar

x g= gravedades

g= gramo

IH= Inhibición de la hemoaglutinación

i.d.= intradermoreacción

IL1- β = Interleucina 1-beta

IL 2= Interleucina 2

IFN γ = Interferón gama

KDa= Kilodaltones

L:O= luz : oscuridad

LT= Linfocitos T

LTc= Linfocitos T citotóxicos

LTh⁺= Linfocitos T *helper* (cooperadores)

MgCl₂= Cloruro de magnesio

MHC= Moléculas de histocompatibilidad

mL= mililitro

min= minutos

mM= mili molares

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

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

NaCl= Cloruro de sodio

pb= pares de bases

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

RI= Respuesta Inmune

RIC= Respuesta Inmune Celular

RIH= Respuesta Inmune Humoral

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

S.S.F= Solución salina fisiológica

TGF-β= Factor transformante del crecimiento-beta

°C= grados Celsius

μg= microgramo

μl= microlitros

μM= micro molares

RESUMEN

TÉLLEZ NÚÑEZ RODRIGO ERNESTO. EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA EN POLLOS INMUNIZADAS CONTRA INFLUENZA AVIAR (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DRA. LAURA COBOS MARÍN Y MPA. FRIDA SALMERÓN SOSA).

Se realizó un estudio para determinar la expresión de dos citocinas: IL2 e IFN γ así como para medir los niveles de anticuerpos séricos en aves inmunizadas contra Influenza aviar y Factor de transferencia. El experimento se llevó a cabo con 60 pollos sanos que se dividieron en cuatro grupos. A un grupo se le inoculó dos dosis de factor de transferencia junto con una dosis de vacuna, a otro grupo con sólo factor, otro con sólo vacuna y un grupo testigo (S.S.F.). Se tomaron muestras de suero (a los 10, 17, 24 y 31 días de edad) y una muestra de bazo a 5 pollos de cada grupo al día 17. Las muestras de bazo se sometieron a RT-PCR para buscar la expresión del RNAm de las citocinas IL2 e IFN γ . A los sueros se les realizó una prueba de IH y ELISA para determinar la cantidad de anticuerpos séricos. Los resultados muestran que el FTA aplicado junto con la vacuna aumentó los niveles de anticuerpos al día 21 post tratamiento ($P > 0.001$). No se pudo demostrar el aumento de la producción de citocinas.

INTRODUCCIÓN

El empleo de adyuvantes que mejoren la respuesta inmune a la vacunación ha sido abordado desde diferentes enfoques, estudios recientes han identificado la naturaleza química de los adyuvantes, así como sus mecanismos de acción, lo que ha dado como resultado: encontrar los diferentes receptores celulares para su activación, modular la respuesta Th1 hacia Th2, inducir la inmunidad en mucosas, aumentar la memoria celular, estimular la respuesta innata, así como reducir la dosis de antígeno mientras se aumenta la habilidad biológica¹. Un ejemplo de adyuvante son las citocinas que ayudan a estimular la activación de linfocitos²,

En aves se han empleado citocinas para modular la respuesta inmune en la protección contra *Salmonella* spp.³ y la Enfermedad de Marek⁴, en pruebas *in vitro* para la activación de heterófilos⁵ y en la vacunación contra la Enfermedad de Newcastle⁶ e Influenza Aviar (IA)⁷; sin embargo, su empleo es difícil debido al costo y a la infraestructura necesaria para su producción, por lo que el uso de un inmunomodulador que pueda obtenerse a menor precio, como el Factor de Transferencia (FT) puede ser una alternativa para mejorar la respuesta a la vacunación.

Factor de transferencia

En los años 1940's, 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 células de exudado peritoneal de cobayos sensibilizados a tuberculina, dando como resultado que los animales no sensibilizados adquirieran la capacidad de expresar la RIC de los donadores⁸. Estudios posteriores en animales indicaron que la transferencia era

mejor cuando se realizaba entre donadores y receptores que tuvieran alguna relación singénica y sólo cuando se utilizaban células intactas y vivas⁸.

En 1949, Lawrence demostró que la transferencia celular también era posible en humanos. Inicialmente utilizó linfocitos viables intactos de un individuo normal con una intradermorreacción (i.d.) positiva a la tuberculina y los inyectó a un individuo con una i.d. negativa a la tuberculina provocando que este segundo individuo, al ser posteriormente retado con el antígeno presentara una respuesta⁹. 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, lo que eliminaba la posibilidad de que el efecto fuese causado por anticuerpos¹⁰. Lawrence creyó que estos dializados contenían una sola especie molecular, sin embargo en la actualidad son conocidos como un conjunto de moléculas llamadas extractos dializables leucocitarios o DLE (Dialyzable Leukocyte Extracts).

El mecanismo por el cual el FT ejerce su efecto biológico no ha sido completamente establecido, sin embargo los primeros estudios demostraron que transfiere la RIC de forma antígeno específica¹¹, inhibe la migración de macrófagos, aumenta la proliferación y actividad de los linfocitos T¹², induce la producción de citocinas en respuesta a antígenos específicos y aumenta la resistencia a infecciones en inmunodeficiencias de carácter genético; estudios más recientes han demostrado que el FT induce la producción de citocinas como la interleucina 2 (IL2) y el interferón γ (IFN γ)^{13,14}.

De manera general, los componentes de los extractos dializables de leucocitos se agrupan en dos fracciones principales:

- ❖ La fracción *antígeno específica o antígeno dependiente* corresponde a moléculas de naturaleza peptídica con un peso molecular de 3.5 a 6 KDa. En ella se encuentra a los FT, los cuales han sido identificados químicamente como péptidos pequeños con capacidad de transferir respuesta del tipo de la hipersensibilidad retardada. Esta fracción contiene teóricamente, diferentes FT específicos para cada antígeno encontrado durante la vida del individuo. Algunas moléculas comprendidas en esta fracción ya han sido estudiadas y secuenciadas parcialmente^{15,16}.
- ❖ La fracción *antígeno inespecífica o antígeno independiente* está comprendida por moléculas por debajo de 3.5 y por arriba de 6 KDa, en la cual se encuentran prostaglandinas, nicotinamida, ácido ascórbico, histamina, hipoxantina, serotonina, factores de diferenciación de linfocitos (timosina), quimioatrayentes para monocitos y factores inmovilizadores de neutrófilos. Además, dentro de dicha fracción, Gottlieb (1991) purificó dos potentes moléculas inmunorreguladoras que son activas a concentraciones de menos de 1 microgramo por mililitro. Estas moléculas son conocidas como IMREG I e IMREG II. Ambas moléculas poseen la misma actividad biológica y pueden amplificar, pero no transferir, respuestas de hipersensibilidad retardada¹⁷.

El FT ha sido ampliamente utilizado en humanos para la protección contra el cáncer¹⁸ y para el control de enfermedades virales^{19,20,21}, micobacterianas²² y parasitarias^{23,24}.

El FT en medicina veterinaria

En medicina veterinaria el FT se ha utilizado en varias especies, Simon *et al.* en 1977 sensibilizaron con una proteína de tuberculina a 5 perros para obtener FT específico y lo inocularon a receptores no inmunes, generando resultados positivos a pruebas de i.d.²⁵; Calzada en el 2000 realizó un estudio del uso de FT en la vacunación contra la Enfermedad de Aujeszky, en el que se demostró la efectividad del FT ante el desafío con una cepa patógena reduciendo signos, lesiones pulmonares y mejorando la respuesta celular²⁶, Rojas en 1987 evaluó el FT en lechones neonatos para el tratamiento de colibacilosis²⁷ y Torres en 1994 trabajó con el FT en *A. pleuroneumoniae* y *P. multocida* en cerdos adultos²⁸; en bovinos se realizó un estudio donde se utilizó el FT junto con calostro para becerros lactantes²⁹ y en aves se estudió la respuesta celular después de inmunizarlas con FT obtenido de calostro y leche de bovino³⁰.

Inmunidad en aves

El sistema inmune de las aves es muy similar al de los mamíferos, la estimulación antigénica inicia la respuesta inmune celular y humoral. La respuesta humoral incluye la producción de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en las mucosas. La respuesta celular está dada por los linfocitos T, los macrófagos y las células NK, que son importantes en las infecciones virales³¹.

En aves, los linfocitos T y B inmaduros son células que se originan en la médula ósea, después migran al timo, donde maduran como linfocitos T o bien migran a la bolsa de Fabricio donde se maduran los linfocitos B. Los linfocitos T y B respectivamente comienzan a salir del timo y de la bolsa de Fabricio antes del nacimiento del pollo y migran

a los órganos linfoides secundarios como el bazo, tonsilas cecales y la glándula de Harder (membrana parpadeante paraocular)³².

La inmunidad humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B; es efectiva contra patógenos extracelulares y sus productos, ya que la inmunoglobulina puede unirse a los antígenos y controlar la infección a través de diversos mecanismos: 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.

La respuesta inmune celular está regulada por linfocitos T cooperadores CD4+, entre de estos, los TH1 se encargan de la producción de citocinas tales como $IFN\gamma$ e $IL2$ ³³; las funciones del $IFN\gamma$ son: activar a los macrófagos estimulando su acción microbicida, aumentar los niveles de inmunoglobulina G (IgG), regular de manera positiva la expresión de la molécula de histocompatibilidad (MHC) clase II y favorecer la secreción de citocinas como $IL2$, la cual induce que las células TH se diferencien en TH1 (creando retroalimentación positiva); las funciones de la $IL2$ son inducir la proliferación de LTC (linfocitos T citotóxicos)^{34,35} y la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas³⁶.

En las aves han sido caracterizadas molecularmente las siguientes citocinas: Interferón tipo I^{37,38} y II ($IFN\gamma$)³⁹, Factor de crecimiento mielomonocítico (MGF)⁴⁰, Factor transformante del crecimiento- β ($TGF-\beta$)⁴¹, Interleucina I- β ($IL1-\beta$)⁴², Interleucina 2 ($IL2$)⁴³, Interleucina 4 ($IL4$)⁴⁴, Interleucina-6 ($IL6$), Interleucina 8 ($IL8$)⁴⁵, Interleucina 10 ($IL10$)⁴⁶, Interleucina 12 ($IL12$)⁴⁷, Interleucina 15 ($IL15$)⁴⁸ e Interleucina 18 ($IL18$)^{49,50}.

Influenza aviar

La IA es una enfermedad viral causada por el virus influenza tipo A, miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. 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 (HA) y tetrámeros con forma de hongo correspondientes a la neuraminidasa (NA)^{51, 52}. Actualmente se conocen 16 subtipos de HA (de H1 a H16)⁵³ y 9 de NA (de N1 a N9)⁵².

Esta enfermedad se clasifica en IA de Alta Patogenicidad (IAAP) e IA de Baja Patogenicidad (IABP) la primera tiene mayor repercusión económica, ya que es la que ocasiona una mayor mortalidad en el campo. La IABP puede variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad respiratoria con pérdidas en la producción; en algunas ocasiones la IABP en el campo se asocia con patógenos secundarios⁵⁴.

La diferencia entre IAAP y IABP es que la primera tiene una replicación sistémica mientras que la IABP se replica localmente en mucosas. Esto es debido a las diferencias en el sitio de corte de la proteína H en los subtipos H1 y H2, que son necesarios para que el virus infecte a la célula. La proteína H del virus de IAAP se puede unir mediante proteasas endógenas que se encuentran en la mayoría de las células del cuerpo, mientras que las proteína HA de IABP sólo se puede unir a proteasas de tripsina que se encuentran principalmente en el tracto respiratorio y digestivo⁵⁵.

En México, la enfermedad se encuentra regulada por la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (NOM-044-ZOO-1995), actualmente sólo está presente el virus H5N2 de baja patogenicidad^{56,57}.

La diseminación del virus de IA ocurre a través de los aerosoles provenientes del tracto respiratorio o a través de las heces, o de manera indirecta, por el agua o alimento contaminados.

Diagnóstico

Acorde con la norma oficial mexicana, el diagnóstico de la IA se puede orientar clínicamente y confirmar en el laboratorio.

El diagnóstico clínico se realiza mediante la evaluación de los signos que se observan en las aves afectadas: tos, estornudos, dificultad para respirar, ataxia, secreción nasal, enrojecimiento de la cresta, petequias en las patas y disminución de la producción.

El diagnóstico de laboratorio se hace mediante el aislamiento del virus para determinar la patogenicidad así como por pruebas serológicas tales como la precipitación en gel agar (PAG) y la inhibición de la hemoaglutinación (IH)⁵⁶.

También se realiza el diagnóstico mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), en los que se pueden utilizar dos formatos: ELISA indirecto y ELISA competitivo. El ELISA indirecto utiliza un anticuerpo secundario anti pollo/anti pavo que lo hacen una prueba muy específica^{58,59}. El ELISA competitivo utiliza anticuerpos monoclonales de ratón que compiten con los anticuerpos del suero para unirse al antígeno NP de influenza, el anticuerpo secundario se une al anticuerpo monoclonal de ratón y de esta manera una muestra positiva tendrá una menor absorbancia al momento de hacer la lectura. La ventaja principal del ELISA competitivo es que puede realizarse con muestras de suero de diferentes animales, tanto mamíferos como aves^{60,61}, la desventaja de esta prueba es la necesidad de equipo especial para realizar su lectura.

Vacunación

Un componente responsable de la patogenicidad de este virus es la proteína H, la cual media la adherencia de los virus con los sitios receptores de la superficie de la célula a infectar con subsecuente fusión de la envoltura viral y 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 la protección por seroneutralización. La composición química de un virión de IA es: 70% proteínas, 20% lípidos, 5-8% carbohidratos y 0.8-1.0% ARN⁶². Las glicoproteínas y los glicolípidos contienen a los carbohidratos galactosa, manosa, fucosa y glucosamina⁶³, mientras que la envoltura contiene a los lípidos (la mayoría fosfolípidos), que son derivados de la célula huésped.

En México, desde 1995 se usa una vacuna de virus inactivado en emulsión que se elabora a partir de la cepa oficial que distribuye el gobierno (A/chicken/Hidalgo/1995); si bien el uso de esta vacuna disminuye la presentación de signos clínicos, no evita la infección permitiendo que los virus de campo continúen circulando en las granjas⁶⁴. También se usan vacunas recombinantes, la primera de viruela aviar que expresa antígenos de H5 esta reduce los signos clínicos y disminuye la diseminación del virus por cloaca y tracto respiratorio⁶⁵, pero no protege totalmente contra la infección⁶⁶ y la segunda vacuna recombinante del virus de la Enfermedad de Newcastle que expresa antígenos H5 de IA⁶⁷. La vacunación es la mejor opción de control contra el virus de IA⁶⁸, como se muestra en la figura 1, la situación de la IA en México a partir de la vacunación en algunos estados se ha controlado la enfermedad, teniendo zonas de erradicación y zonas libres.



Figura 1. Situación de la IA en México (2007). La zona de erradicación significa un área geográfica delimitada en la cual no existe evidencia serológica ni viral de la IA y en la que se ejercen estrictas medidas zoonosanitarias tendentes a evitar la introducción o reintroducción de la enfermedad, apoyándose en una completa y eficiente infraestructura cuarentenaria y un adecuado sistema de vigilancia epizootiología. La zona libre es un área geográfica determinada en la cual no se han presentado aislamientos virales o evidencia serológica de la IA o bien, han sido eliminados en un periodo específico⁵⁶.

Impacto económico

Desde su aparición hasta la fecha la IA ha causado grandes pérdidas económicas alrededor del mundo, ejemplo de esto es que en Italia entre 1999 y 2000 se presentó un brote de IAAP el cual afectó a más de 13 millones de aves⁶⁹; mientras que en Holanda se sacrificaron cerca de 30 millones de aves después de la aparición de un brote de IA en el

2003⁶⁹. Por otro lado aproximadamente 42 granjas comerciales y 11 granjas de traspatio se vieron afectadas por lo que se tuvieron que sacrificar a 17 millones de aves (90% de la población del área) en Canadá⁶⁹, lo que significó una pérdida de millones de dólares.

JUSTIFICACIÓN

El efecto terapéutico del FT ha sido demostrado en diversas enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales, lo que indica que puede emplearse como un inmunomodulador de bajo costo, que puede aplicarse para mejorar la respuesta inmune que generan las vacunas inactivadas, tal como se demostró en un modelo de cerdos vacunados contra Aujeszky (Calzada, 2000). Se eligió a la IA como modelo de estudio debido a que en México comúnmente se emplean vacunas inactivadas para controlarla ya que ésta sigue siendo un problema en la producción avícola. Si se demuestra que el FTa modula favorablemente algunos parámetros inmunológicos después de la vacunación contra IA, se pueden abrir las puertas para buscar mediante una valoración inmunológica detallada y pruebas de campo, el número de dosis, vías de administración y edad en la que se genere una mejor inmunomodulación y en su caso evaluar la factibilidad de emplearlo como un producto comercial no solo en la vacunación contra IA, sino con algunos otros productos biológicos para mejorar su efectividad.

HIPÓTESIS

Dos dosis de factor de transferencia aviar (FTa) específico aplicadas en aves por vía subcutánea junto con una vacuna emulsionada comercial contra IA mejorarán la respuesta

inmune al aumentar la expresión del ARN mensajero para las citocinas IL2 e IFN γ , así como la producción de anticuerpos específicos contra IA.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del FTa como inmunomodulador en la profilaxis contra IA en aves vacunadas mediante la utilización de técnicas serológicas y moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Inmunizar aves contra IA mediante la aplicación de una vacuna emulsionada comercial y de FTa por vía subcutánea, para obtener suero y el bazo de los animales vacunados.
- Medir la cantidad de anticuerpos producidos por las aves inmunizadas contra IA e inmunoestimuladas con FTa mediante las técnicas ELISA e IH para determinar si el FTa modula la RIH.
- Determinar si el FTa incrementa la expresión de IL2 e IFN γ mediante el empleo de RT-PCR para definir si hay impacto sobre la RIC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales:

La población constó de 60 pollos de engorda comerciales, clínicamente sanos de 1 día de edad de la línea Cobb, a los que se les proporcionó alimento comercial y agua potable *ad libitum* y se mantuvieron bajo las siguientes condiciones 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 estudio y se disminuyó a razón de 2°C cada 5 días hasta la edad de 20 días⁷⁰.

Las criadoras se ubican en el animalario de la FMVZ-UNAM del Departamento de Microbiología e Inmunología, que tiene una temperatura ambiental de 18.5°C \pm 1, una humedad relativa de 45.5%, ventilación continua por medio de 2 extractores, un ciclo de iluminación de 12 h: 12 h (L: O) que se proporciona por medio de 2 lámparas de luz blanca de 38 watts cada una.

La vacuna que se empleó es una vacuna emulsionada contra IA de uso comercial aplicándose 0.5 mL por vía subcutánea.

EL FTa que se utilizó, se elaboró en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, según lo descrito por Bravo (2007) y se inocularon 0.5mL por vía subcutánea.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos como se muestra en el cuadro 1:

Cuadro 1. Conformación de los grupos para los diferentes tratamientos.

Grupo	No. de animales	FT	Vacuna
FTa + Vacuna	15	✓	✓
FTa	15	✓	—
Vacuna	15	—	✓
Testigo	15	—	—

Los animales del grupo FTa + vacuna y FTa recibieron una primera dosis de FTa al día de edad y una segunda dosis al día 10, en este último las aves de los grupos FTa + vacuna y vacuna recibieron 1 dosis de vacuna comercial de IA. Se obtuvieron muestras de sueros a los días 10, 17, 24 y 31 de todas las aves de los cuatro grupos.

Obtención del Suero

Se obtuvieron entre 0.5 y 1.0 mL de sangre, a partir de la vena radial siguiendo la técnica descrita en el manual de AVMA⁷¹, la muestra se tomó sin anticoagulante, posteriormente se centrifugó a 500 x g. durante 5 minutos para obtener el suero, el cual se retiró y almacenó en microtubos de 1.5 mL a -25° C. Las muestras se utilizaron para la realización de las técnicas de IH y ELISA.

Determinación de Anticuerpos

La detección de anticuerpos se realizó mediante dos técnicas:

1. Inhibición de la Hemoaglutinación (IH)

En una microplaca de 96 pozos de fondo en U, se hicieron diluciones dobles seriadas del suero en 10 pozos (1:2 a 1:1024), de la siguiente manera: se agregaron 25 µl de PBS en todos los pozos, después se agregaron 25 µl de suero al primer pozo, se homogenizó, se realizaron las diluciones dobles siguientes y se desecharon 25 µl del último pozo. Se agregaron 25 µl de virus a todos los pozos; el virus se estandarizó en 4 Unidades Hemoaglutinantes (UHA). Se agregaron 25 µl de una suspensión de eritrocitos de ave al 1.0 % a todos los pozos. Se agitó suavemente la placa, se dejó incubar a temperatura ambiente y se realizó la lectura a los 30 y 45 minutos. Se tuvieron pozos testigo a los cuales se les agregarán 50 µl de PBS y 25 µl de la suspensión de eritrocitos de ave al 1%. Se realizó la

lectura final cuando los eritrocitos de los testigos y del control del virus se sedimentaron para formar un botón bien delimitado. El punto final se obtuvo cuando en la dilución más alta del suero se observó el 100% de inhibición de la hemoaglutinación.

2. ELISA

El principio de esta prueba es el uso de anticuerpos anti IgG de pollo/pavo marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad enzimática; se produce una coloración observable a simple vista al agregar un sustrato específico para la enzima, que se puede cuantificar mediante el uso de un espectrofotómetro. El ELISA que se utilizó para este experimento es el paquete para la detección de anticuerpos contra el virus de la Influenza Aviar¹

Se realizó una dilución del suero 1:500 con el diluyente de muestras antes de efectuar el análisis. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano; se agregaron 100 µl de la muestra diluida en los pozos correspondientes, se dejaron incubar 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron cinco lavados de los pozos con 350 µl de agua destilada. Se agregaron 100 µl de conjugado anti-pollo/anti-pavo: peroxidasa de rábano a cada pozo., se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente; se realizaron los lavados correspondientes y se agregaron 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada pozo, dejándose incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para terminar la reacción se agregaron 100 µl de la solución de frenado en cada pozo y se leyó la absorbancia en un lector de placas con un filtro de 650 nm.

¹ FlockChek TM, IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME 04092 USA

Evaluación de la expresión de citocinas

Obtención de Bazo

Al día diecisiete de edad de manera aleatoria se seleccionaron a 5 pollos de cada grupo, se obtuvieron 80 mg del bazo de cada uno, se maceraron, se recolectaron en microtubos de 1.5 mL con 500 μ l de Trizol^{II}® y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

El método de sacrificio de las aves fue por dislocación cervical de acuerdo con las especificaciones del manual de manejo de animales de laboratorio⁷¹ y la NOM-062-ZOO-1999⁷².

Obtención de ARN y realización de RT-PCR

Se realizó la extracción de ARN de cada una de las muestras de bazo siguiendo el protocolo que marca el laboratorio que produce Trizol^{III}®. El ARN total se transcribió a ADN copia (ADNc) usando una transcriptasa reversa MMLV-RT^{IV} y un oligo dT^V mediante el siguiente protocolo:

La muestra de ARN se centrifugó a 14,000 x g/20 min., se retiró el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 500 μ l de etanol al 80% en agua dietil pirocarbonato (DEPC), posteriormente se centrifugó a 3,300 x g/6 min., se retiró todo el etanol, la pastilla de ARN se secó a temperatura ambiente, se cuantificó en un biofotómetro de la marca Eppendorf^{VI}. Posteriormente a 3 μ g de RNA contenidos en 13 μ L de agua dietil pirocarbonato (DEPC), se añadieron 2 μ L del oligo dT (0,5 μ g/ μ L), se incubó a 65°C/10 min., y posteriormente a

^{II} Invitrogen Corporation 1600 Faraday Ave. Carlsbad, CA 92008.

^{III} Molecular Research Center, Inc. 5645 Montgomery Rd. Cincinnati, Ohio 45212 USA.

^{IV} Invitrogen Corporation 1600 Faraday Ave. Carlsbad, CA 92008.

^V 5'-pd (T)₁₂₋₁₈ Invitrogen Corporation 1600 Faraday Ave. Carlsbad, CA 92008.

^{VI} BioPhotometer 6131 Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 Hamburg Deutschland.

4°C/5 min. Se agregaron 15 µL de la mezcla de reacción (agua DEPC, 6µL solución amortiguadora 5X, 200 U M-MLVRT, 1,2 µL dNTP's 400µM, 3 µL DTT 100mM) y se incubó a 37°C/1 hora y a 95°C/5 min.; terminada la reacción se centrifugó 5 segundos y se resuspendió en 20 µL de agua DEPC.

Determinación de la expresión de citocinas.

Para la amplificación del ARNm de las diferentes citocinas se utilizaron los iniciadores descritos en el cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de los iniciadores utilizados para la detección del ARNm.

INICIADORES	Peso molecular
β-actina	(582 pb)
• 5' CCC TGA AGT ACC CCA TTG AAC ACG	
• 3' CCT CGG GGC ACC TGA ACC TCT	
IFN γ (Loza, 2003)	(702 pb)
• 5' GTG AAG AAG CTG AAA GAT ATC ATG GA	
• 3' GTC TTG CGC TGG ATT CTC A	
IL2 (Rothwell, 2004)	(469 pb)
• 5' TTG GAA AAT ATC AAG AAC AAG ATT CAT C	
• 3' TCC CAG GTA ACA CTG CAG AGT TT	

Para verificar que la extracción del ARNm y la obtención del ADNc se realizó exitosamente, primero se buscó la expresión del gen de β actina, ya que este es un gen constitutivo, lo que significa que se está generando un control positivo para la extracción.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para β actina se realizó en un volumen de 25 μ L: 2,5 μ L de ADNc, 0,05mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP's, 0,2 μ M de iniciador β -actina 5' e iniciador β actina 3' y 1U de *Taq* polimerasa, en las siguientes condiciones de amplificación: 30 ciclos de 94°C/45 segundos, 60°C/45 segundos, 72°C/90 segundos y 1 ciclo de 72°C/7 min.

Se procedió a la determinación del IFN γ y la IL2; para el ARNm de IL2 se utilizaron las condiciones de amplificación y los iniciadores descritos por Loza (2003) en un volumen de 25 μ L: 2,5 μ L de ADNc, 2,5mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP's, 0,8 μ M de cada iniciador, gelatina molecular al 0,001% y 1U de *Taq* polimerasa, con las siguientes condiciones para su amplificación: 75 segundos a 92 °C, 30 ciclos de 45 segundos a 92 °C, 60 segundos a 50 °C, 60 segundos a 72 °C y un último ciclo de 7 minutos a 72 °C.

Para IFN- γ se emplearon los iniciadores y condiciones citados por Rothwell y col. (2004) con las siguientes modificaciones: en un volumen de 25 μ L: 2,5 μ L de ADNc, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP's, 0,2 μ M de cada iniciador y 1U de *Taq* polimerasa, con las siguientes condiciones: 2 minutos a 94 °C, 36 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 53 °C, 90 segundos a 73 °C y un último ciclo de 7 minutos a 72 °C. Posteriormente se registraron y contabilizaron los resultados de las expresiones, como presencia y ausencia de la banda correspondiente a cada citocina.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis zonal en un gel de agarosa al 1% a 90 volts durante 45 minutos, se utilizó el marcador de peso Kb, se tiñeron con bromuro de etidio al 0.01% y se visualizaron en un fotodocumentador^{VII}

^{VII} Gel Logic 2000 Imaging System. Bio-Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547

RESULTADOS

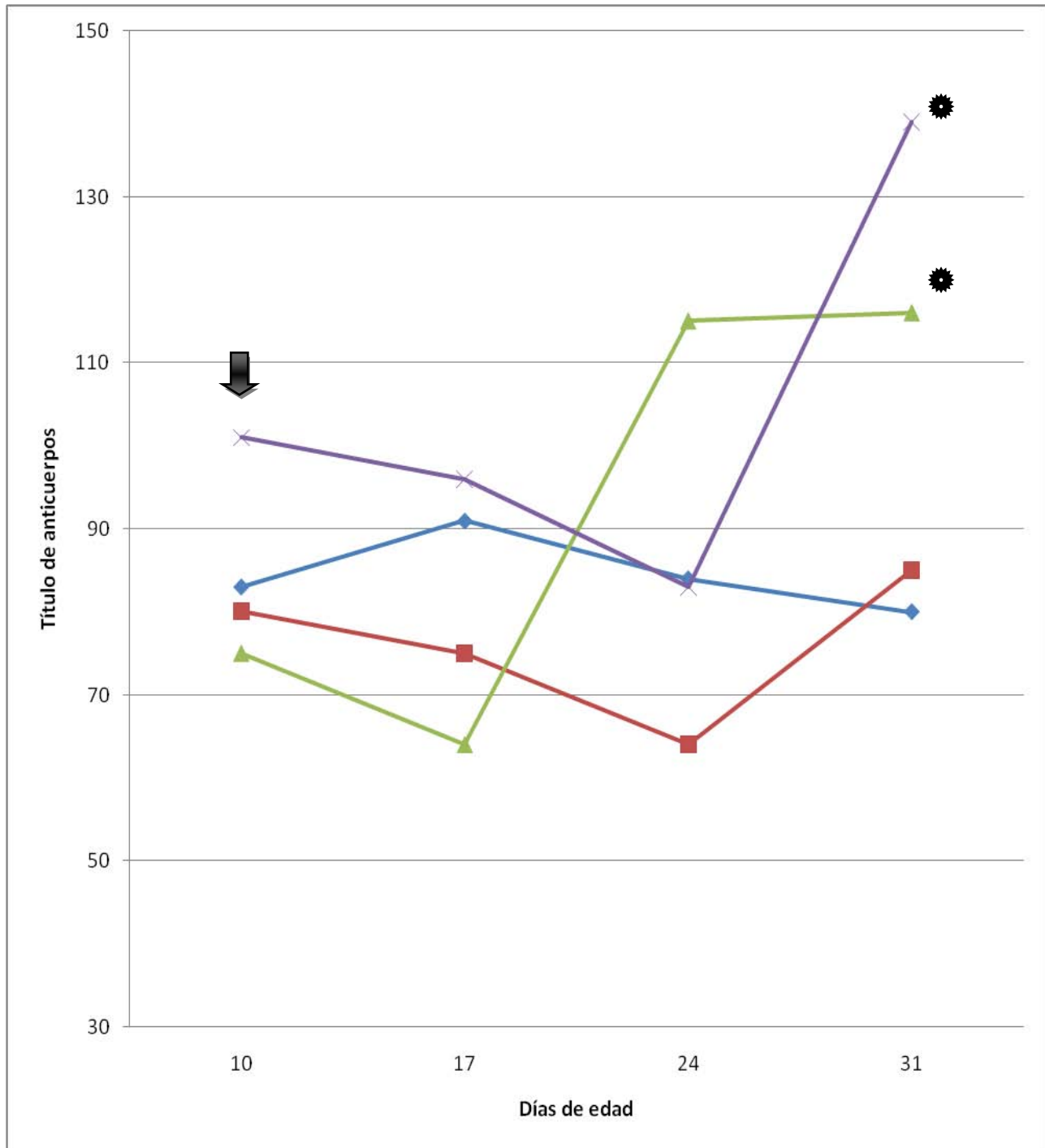
Para la prueba de IH se utilizó el análisis unilateral de la varianza por jerarquías de Kruskal – Wallis para los tratamientos en los diferentes días de edad, teniendo como resultado que el tratamiento de FT + vacuna es diferente ($P < 0.05$) a los demás tratamientos, ya que se encontró el valor medio mayor (título de 139) con respecto a los otros tratamientos (ver cuadro 3). Para la prueba de ELISA los resultados de la DO se transformaron a título de anticuerpos mediante el programa Xcheck^{VIII}, a los datos transformados se les hizo un análisis de varianza dando como resultado que al día 31 hay una diferencia altamente significativa entre tratamientos ($P < 0.001$), donde el tratamiento de FT + vacuna y el de vacuna tuvieron los mayores valores y fueron diferentes ($P < 0.001$) con respecto a los tratamientos de FT y el testigo (ver cuadro 3), también se observa en ambas pruebas que el grupo de FT + vacuna es diferente al grupo de vacuna (figura 2 y 3).

Cuadro 3. Resultados de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	D Í A S							
	10		17		24		31	
	IH	ELISA	IH	ELISA	IH	ELISA	IH	ELISA
Testigo	83	2534	91	2431	84	2399	80 ^a	2365 ^a
FT	80	2382	75	2453	64	2373	85 ^a	2372 ^a
Vacuna	75	2371	64	2394	115	3070	116 ^b	24074 ^b
FT + Vacuna	101	2389	96	2398	83	2734	139 ^c	38100 ^c

^{a, b, c} Literales distintas significan valores estadísticamente diferentes.

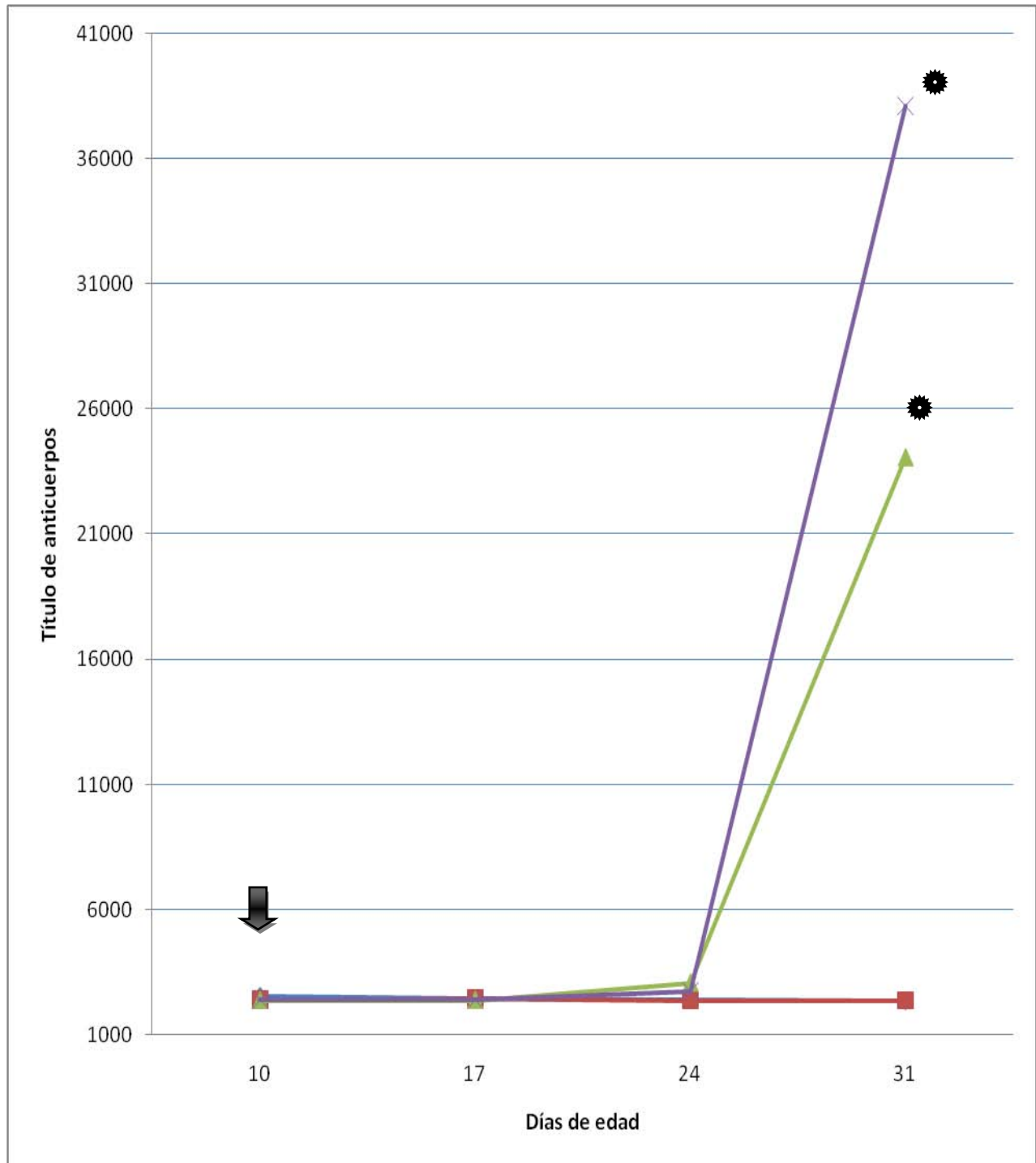
^{VIII} IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME 04092 USA



■ Testigo
 ■ Ft
 ■ Vacuna
 ■ Ft + vacuna

Figura 2. Título de anticuerpos en la prueba de IH para los diferentes tratamientos.

✱ ($P < 0.05$)
 ⬇ Día de la vacunación



■ Testigo
 ■ Ft
 ■ Vacuna
 ■ Ft + vacuna

Figura 3. Título de anticuerpos en la prueba ELISA para los diferentes tratamientos.

⚙ (P < 0.001)
 ⬇ Día de la vacunación

PCR

A las muestras de bazo se les realizó el PCR para β actina, y todas resultaron positivas (figura 4). Los resultados para las citocinas IL2 e IFN γ no dieron ninguna diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) ver figura 5.

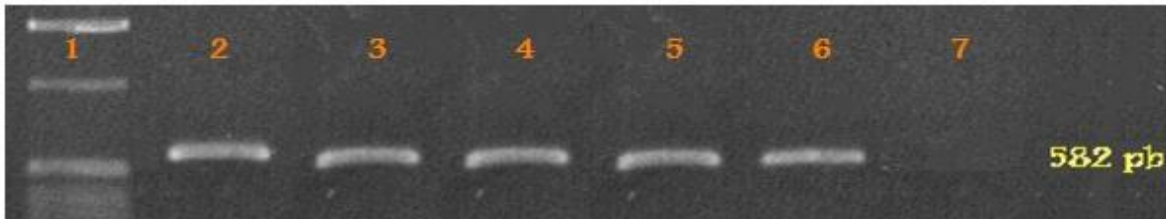


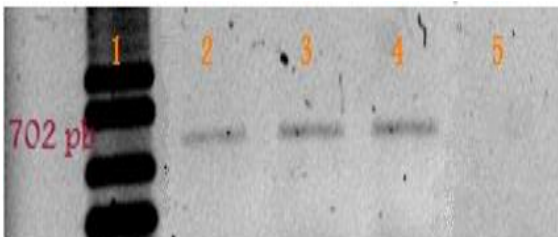
Figura 4. Producto de PCR de β actina, carril 1: marcador de peso, carril 2: control positivo, carril 3: FT + vacuna, carril 4: FT, carril 5: vacuna, carril 6: testigo y carril 7: control negativo.

A)

Interferón γ	Positivos	Negativos
FT	1	4
Vacuna + FT	1	4
Vacuna	0	5
Testigo	0	5

Interleucina 2	Positivos	Negativos
FT	1	4
Vacuna + FT	1	4
Vacuna	0	5
Testigo	0	5

B)



C)

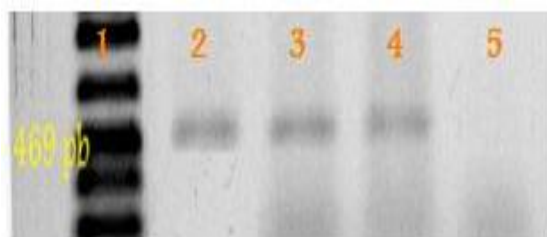


Figura 5. Resultados de la expresión del ARNm para IFN γ e IL2 A) Total de muestras positivas a la expresión del ARNm de ambas citocinas por grupo. B) Producto de PCR para IFN γ : carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo, carril 3: FT + vacuna, carril 4: FT, carril 5: control negativo. C) Producto de PCR para IL2: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo, carril 3: FT + vacuna, carril 4: FT, carril 5: control negativo.

DISCUSIÓN

Se encontró que el FTa aplicado al mismo tiempo que la vacuna inactivada de IA aumenta los niveles séricos de anticuerpos a los 21 días posinmunización (31 días de edad), tanto en IH ($P < 0.05$) como en ELISA ($P < 0.001$). En la prueba de IH, aunque la diferencia entre los animales del grupo de FTa + vacuna (título de 139) es estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a los animales del grupo que solamente recibió la vacuna (título de 116) se hubiera esperado un aumento mayor a 2 logaritmos para considerar que hubo seroconversión, desde el punto de vista diagnóstico; sin embargo, al realizar la prueba de ELISA se observa la misma tendencia mostrada por la técnica de IH, encontrándose una diferencia significativa mayor ($P < 0.001$) entre los animales del grupo vacunado (título de 24074) con respecto a los animales del grupo que recibió FTa + vacuna (título de 38100). Algunos estudios coinciden con nuestros resultados, en donde se demuestra que el FT produce un aumento en la respuesta humoral tal es el caso de Ascher y col. (1973) que reportaron un paciente con deficiencias en el cambio de isotipo de las células B tratado con FT, en el que se observó un aumento de la producción de IgG y una disminución de la IgM⁷³. Así mismo, en un estudio realizado por Valderrabano *et al.* (2008) en el que se evaluó la producción de anticuerpos en ratones Balb/c inmunizados con extractos dializables leucocitarios (DLEs) y ovoalbúmina (OVA) en diferentes días (0, 14, 21 y 28 días), donde se vio que al día 28 los animales que reciben OVA y DLE's generan una mayor producción de IgG contra el antígeno⁷⁴.

El aumento de anticuerpos hasta las tres semanas posvacunación era lo esperado ya que se empleó una vacuna inactivada y coincide con lo reportado por Trani *et al.* en donde empleando la prueba de ELISA los títulos de anticuerpos aumentan a los 14 días y alcanzan su máximo a los 21 días posvacunación⁷⁵; así como con lo publicado por Swayne *et al.* que

demuestran que una vacuna inactivada de IA produce entre el 90 y 100% de respuesta de anticuerpos (medidos por IH y PAG) a las 3 semanas posvacunación⁷⁶, aunque se sugiere hacer un estudio en donde se hagan mediciones por más tiempo para poder determinar si el aumento de anticuerpos se mantiene o en su caso se incrementa o disminuye.

No existen reportes en aves que demuestren que el FTA aumente los niveles de anticuerpos, por lo que este es un hallazgo importante que abre un campo nuevo del conocimiento sobre el papel de FTA en la modulación de la respuesta humoral, aun cuando esto no demuestra una protección contra el desafío. Debido a que los anticuerpos juegan un papel importante en la neutralización viral^{77,78,79,80}, se necesita un estudio en el que se determine si el FTA aplicado en aves puede aumentar los niveles de IgA secretora ya que es importante para la protección en mucosas, para demostrar si hay coincidencias con lo reportado por Hernández (2008), en donde se analizaron sueros obtenidos de 80 ratones Balb/c infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv y tratados con quimioterapia convencional en combinación con factor de transferencia murino, y se demostró que el FT aumenta los niveles séricos de IgA secretora a los 60 días pos infección⁸¹. Además, es conveniente un estudio de desafío con IABP para determinar si en los animales inmunizados con vacuna inactivada y FTA se disminuye la excreción viral.

Finalmente, el hecho de que el FTA aumente la respuesta de anticuerpos, podría favorecer a la respuesta celular, hallazgos recientes muestran claramente el efecto de la presencia de los anticuerpos sobre los procesos de activación de los linfocitos T, ya que se ha observado que el desarrollo de una respuesta celular de memoria contra microorganismos intracelulares de géneros como *Chlamydia* y *Mycobacterium* requiere del establecimiento de una respuesta humoral generadora de anticuerpos específicos que modulen los procesos de activación de células Th1 vía receptores Fc (FcR) presentes en

células presentadoras de antígeno (APCs), facilitando así la captura y procesamiento del patógeno y la presentación de antígenos para elevar la eficiencia de la respuesta inmune celular⁸².

Los títulos de anticuerpos encontrados a lo largo del experimento en los animales sin vacunar, no coinciden con lo descrito por Ganaphaty *et al.* y Natour *et al.*^{83, 84} quienes reportan una disminución drástica del nivel de anticuerpos maternos entre el día 7 y el 14 de edad, sin embargo Sahin *et al.* (2001) en un estudio realizado para detectar anticuerpos contra *Campylobacter jejuni* reportan que del día 1 al 7 de edad hay una disminución drástica del título de anticuerpos, pero durante los días 14, 21 y 28 se mantiene un nivel bajo de estos⁸⁵. Se cree que el nivel de anticuerpos del grupo testigo en nuestro estudio se puede deber a un alto título de anticuerpos maternos, que es una característica de las líneas de producción mexicanas debido a la constante vacunación⁸⁶, además de que la procedencia de los animales es del estado de Morelos, zona en la que a las reproductoras se les mantiene bajo una constante inmunización y además existe una alta prevalencia del virus de IABP. En este trabajo la primera determinación de anticuerpos se hizo en el día 10 para los cuatro grupos asumiendo que la disminución de anticuerpos sería la misma entre todos ellos y en los resultados esto se demostró al no encontrarse diferencias en el título de anticuerpos entre los cuatro grupos; consideramos que el tener un título de anticuerpos mayor a cero en el grupo testigo no influye en nuestros resultados debido a que hubo diferencia estadística entre el grupo testigo y los grupos vacunados a partir del día 24 (15 días pos vacunación).

Aún cuando no se conoce exactamente cuál es el mecanismo inmunomodulador del FT se sabe que aumenta los niveles de algunas citocinas como la IL2¹³, IFN γ ^{13,17,26,87,88} y factor de necrosis tumoral α (TNF α)^{17,87}. Con base en estas evidencias se buscó medir la

expresión de IFN γ e IL2 en este trabajo; sin embargo no fue posible demostrar el aumento en estas citocinas en los animales tratados con FTa ($P > 0.05$), aún cuando los únicos grupos que las expresaron fueron los de animales tratados con el FTa; las causas posibles de la baja expresión de estas citocinas pueden ser: además del pequeño tamaño de muestra, la edad de los animales, ya que en un trabajo previo en el que se demostró que el FT aplicado en aves aumentó la presencia de estas citocinas, las aves tenían entre 8 y 12 días de edad⁸⁹ y en nuestro estudio tenían 17 días de edad; otra causa pudo ser que al momento de tomar la muestra para de bazo para el RT PCR ya no se estuviera expresando el ARNm de estas citocinas por lo que en otros estudios se sugiere medir los niveles séricos de las citocinas mediante pruebas de ELISA.

CONCLUSIONES

Tanto en la prueba de IH como en la de ELISA se encontró que el FTa aumenta los niveles de anticuerpos a los 21 días pos vacunación ($P < 0.05$ y $P < 0.001$ respectivamente)

No se encontraron diferencias en la expresión de IFN γ e IL2 en los animales tratados con FTa.

Para demostrar el efecto inmunomodulador del FTa se sugiere hacer otros estudios en los que determine: a) los niveles de anticuerpos séricos y en mucosas durante un tiempo más prolongado, b) la expresión del RNAm de citocinas (IL2 e IFN γ) en bazo y los niveles de IFN γ en suero en un período más corto y empleando un mayor número de animales.



REFERENCIAS

- ¹ Bendelac A, Medzhitov R. Adjuvants of Immunity: Harnessing innate immunity to promote adaptative immunity. *J. Exp Med.* 2002; 195 (5): 19-23.
- ² Min W, Lillehoj HS, Burnside J, Weining KC, Staeneli P, Zhujj. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFNgamma, TGF-beta 4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine.* 2001; 20 (1-2): 267-274
- ³ Takehara K, Kobayashi K, Ruttanapamma R, Kamikawa M, Nagata T, Yukomizo Y, Nakumura M. Adjuvant effect of chicken interferon-gamma for inactivated Salmonella enteritidis antigen. *J. Vet. Med. Sci.* 2003; 65 (12): 1337-1341.
- ⁴ Xing Z, Schat K. Inhibitory Effects of Nitric Oxide and Gamma Interferon on In Vitro and In Vivo Replication of Marek's Disease Virus. *J. Virol.* 2000; 74 (8): 3605-3612.
- ⁵ Kogut M, Rothwell L, Kaiser P. Differential effects of age on chicken herophilus and functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Dev Comp Immunol.* 2002; 26 (9): 817-830.
- ⁶ Thiagarajan D, Ram GC, Bansal MP. Optimum conditions for in vitro chicken IL-2 production and it's in vivo role in Newcastle disease vaccinated chickens. *Vet Immunol and Immunopathol.* 1999; 67 (1): 79-91
- ⁷ Zhou J, Wang J, Chen J, Wu J, Gong H, Teng Q, Guo J, Shen H. Cloning, in vitro expression and bioactivity of duck interleukin-2. *Mol Immunol.* 2005; 42(5): 589-598
- ⁸ Landstainer K, Chase W. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1942; 49: 688-690.
- ⁹ Lawrence HS. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949; 71: 516-519.

- ¹⁰ 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.
- ¹¹ Wilson B, Fudenberg H. Leukocyte migration inhibition as a method for assaying transfer factor activities. *Lymphokine. Res.* 1981; 4: 107-73.
- ¹² Levin S, Byers S, Fudenberg H, Wybran J, Hackett J, Johnston O, Spitles E. Osteogenic sarcoma: immunologic parameters before and during immunotherapy with tumor specific transfer factor. *J. Clin. Inv.* 1975; 55: 487-99.
- ¹³ Alvarez-Thull L, Kirkpatrick CH. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy.* 1996; 9:55-59.
- ¹⁴ Kirkpatrick, C. Structural nature and functions of transfer factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993; 685:362-8.
- ¹⁵ Lawrence H, Borkowsky W. A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor –an arcane dialect in the language of cells. *Cell Immunol* 1983; 82(1):102-16
- ¹⁶ Dwyer J. Transfer factor in the age of Molecular biology: A review. *Biotherapy.* 1995; 9:55-59.
- ¹⁷ Fabre A, Perez T, Aguilar D, Rangel J, Estrada I, Hernández R, Estrada S. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 136: 215-223.
- ¹⁸ Pineda, B. Estrada-Parra, S. Interstitial Transfer Factor as Adjuvant Immunotherapy for Experimental Glioma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2005; 24 (4): 575-583.
- ¹⁹ Padierna L, Godinez S, Díaz J, García E, Arguez A, Velasco O, Padierna J, Estrada S. Factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología,* 1985; 11:293-299

- ²⁰ Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Gritti F, Raise E, Fudenberg HH, De Vinci C, Viza D. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy*. 1996; 9; (1-3): 41-7.
- ²¹ Spitler E, Levin S, Stites P, Fudenberg H, Pirofsky B, August C, Stiehm R, Hitzig H, Gatti A. The Wiskott-Aldrich syndrome: results of transfer factor therapy. *J. Clin. Inv.* 1972; 51: 3216-24.
- ²² Bullock E, Fields P, Brandriss W. An evaluation of transfer factor as immunotherapy for patients with lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 1972. 287; (21): 1053-1059.
- ²³ Estrada S, Velasco O, Rébora F, Díaz L, Padierna J. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. *Salud. Publ. Mex.* 1983; 25:589-99.
- ²⁴ Delgado O, Romano L, Belfort E, Pifano F, Scorza V, Rojas Z. Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1981; 19(3):351-359.
- ²⁵ Simon M, Silva J, Freier D, Bruner J, Williams R. Tuberculin-specific transfer factor in dogs. *Infecc. Immunol.* 1977; 18(1): 73-77
- ²⁶ Calzada G. Uso en lechones de Factor de Transferencia y Parapoxvirus inactivado (*Buypamun*) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. (tesis Grado Maestra en Ciencias con especialidad en inmunología) México (D.F.) México: IPN, 2000.
- ²⁷ Rojas S. Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. (tesis de licenciatura) México (D.F.) México: FMVZ. UNAM, 1987.

- ²⁸ Torres, M. Efecto del Factor de transferencia específico en contra de *Actinobacillus pleuroneumoniae* serotipo 5 y *Pasteurella multocida* serotipo A, en cerdos. (tesis de licenciatura) México (D.F.) México: FMVZ. UNAM, 1994.
- ²⁹ Mateos A. Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. Vet. Mex. 1992; 23:4-8.
- ³⁰ Wilson G. 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.
- ³¹ Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph A, Weiss F, Zentella A. Transforming growth factor-beta. Canc Surv. 1992; 12:81-102
- ³² Pastoret P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A. Immunology of birds. In: Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press San Diego California 1998. U.S.A.
- ³³ Erf G. Cell-Mediated Immunity in Poultry. Poult. Sci. 2004. 83:580-590.
- ³⁴ Gillis S, Smith K. A. Long term culture of tumor specific cytotoxic T cells. Nature. 1977. 268: 154-156.
- ³⁵ Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 5° ed. en español. Mc Graw Hill, España, 2004
- ³⁶ Kubi J. Immunology. 3rd ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, editors, Freeman and Company, San Francisco U. S. A. 2002
- ³⁷ Seckellick J, Ferrandino A, Hopkins D, Marcus P. Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis. J. Interferon. Res. 1994; 14:71-79.
- ³⁸ Gandhi S, Burke C, Scholtissek C. Virus RNA síntesis by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus and interferon production. J. Gen. Virol. 1970. 9:97-99.

- ³⁹ Kaiser P, Wain M, Rothwell L. Structure of the chicken interferon- γ gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene*. 1998; 207:25-32.
- ⁴⁰ 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.
- ⁴¹ Jakowlew B, Cubert J, Danielpour D, Sporn B, Roberts B. Differential regulation of the expression of transforming growth factor mRNAs by growth factors and retinoic acid in chicken embryo chondrocytes, myocytes and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 1992; 150:377-385.
- ⁴² Weining C, Sick S, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homologue of mammalian interleukin 1- β cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* 1998; 258:994.
- ⁴³ Kaiser P, Mariani P. Promotor sequence, exon: intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T cell proliferative activity is IL 2 and not IL 15. *Immunogenetics* 1992; 49:26-35.
- ⁴⁴ Avery S, Rothwell L, Degen D, Schijns E, 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 gene 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.
- ⁴⁵ Barker A, Hampe A, Stoeckle Y, Hanafusa H. Transformation-associated cytokine 9E3/CEF4 is chemotactic for chicken peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 1993; 67: 3528-33.

- ⁴⁶ Rothwell L, Young R, Zoorob R, Whittaker A, Hesketh P, Archer A, Smith L, 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
- ⁴⁷ Dagen G, Van Daal N, Van Zuilekom I, Burnside J, Schijns E. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. J. Immunol. 2004;172: 4371-80.
- ⁴⁸ Kaiser P, Underwood G, 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.
- ⁴⁹ Göbel W, Schneider K, Schaerer B, Mejri 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.
- ⁵⁰ Ovington S, Alleva M, Kerr A. Cytokines and Immunological control of *Eimeria* spp. Int. J. Parasitol. 1995; 25: 1331-1351.
- ⁵¹ Swayne, D. Zoonosis Update: Avian Influenza and Newcastle Disease. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2003; 222 (22): 1534-1540.
- ⁵² Cox. N. *Orthomyxoviridae*. In: Virus Taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Van Regenmortel, R. (ed). Hardcover, 1st ed, Academic Press, 2000 San Diego, USA 585-597.
- ⁵³ Fouchier A. Munster V, Wallensten A. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J. Virol 2005; 79 (5): 2814-22.
- ⁵⁴ Suarez D, Schultz S. Immunology of avian influenza virus: a review. Dev. Com. Imm. 2000; 24: 269-283.

- ⁵⁵ Steienhauer D. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenic of influenza virus. *Virology*. 1999; 258 (1): 1-20
- ⁵⁶ Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar. NOM-044-ZOO-1995 (revisada el 01.05.08) disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx>
- ⁵⁷ Flores A y col. Editor. "La Influenza Aviar en México". Memoria. México, Querétaro: Subsecretaria de Agricultura y Ganadería. Dispositivo nacional de emergencia de sanidad animal (1995). México.
- ⁵⁸ Meulemans G, Carlier M, Gonze M, Petit P. Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against influenza viruses in chickens. *Avian Dis*. 1987; 31: 560-563.
- ⁵⁹ Adair B, Todd D, McKillop E, McNulty M. Detection of influenza A type-specific antibodies in chicken and turkey sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathol*. 1989; 18: 455-463.
- ⁶⁰ Shafer A, Katz J, Eernisse K. Development and validation of a competitive -linked immunosorbent assay for detection of Type A influenza antibodies in avian serum. *Avian Dis*. 1998; 42: 28-34.
- ⁶¹ Zhou E, Cha, M, Heckert R, Riva J, Cantin M. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies avian influenza virus nucleoprotein. *Avian Dis*. 1998; 42: 28-34.
- ⁶² Lamb R, Krug M. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology. 2000; 4th edition, editors: Knipe DM, Howley PM,. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1353-1395.
- ⁶³ Klenk D, Keil H, Niemann R, Geyer R. The characterization of influenza A viruses by carbohydrate analysis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1983; 104: 247-257.

- ⁶⁴ Swayne D, Beck J, Garcia M, Stone H. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathol.* 1999; 28: 455–460.
- ⁶⁵ Swayne D, Beck J, Mickle T. Efficacy of recombinant fowlpox vaccine in protecting chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 1997; 41: 910-922.
- ⁶⁶ Taylor J, Weinberg R, Kawaoka Y, Webster R. Protective immunity against avian influenza induced by fowlpox virus recombinant. *Vaccine.* 1988; 6: 504-508.
- ⁶⁷ Veits J, Weisner D; Fuchs W, Hoffmann B; Granzow H, Starick E, *et al.* Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006; 103 (21): 8195-8202.
- ⁶⁸ Beard W. To vaccinate or not to vaccinate. In: Beard CW, Easterday BC, editors. *Proceedings of the second international symposium on avian influenza.* Richmond, Virginia: USA Animal Health Association; 1986. p. 258–63.
- ⁶⁹ Garske T, Clarke P, Ghani A. The transmissibility of High Pathogenic Avian Influenza in Commercial Poultry in Industrialised Countries. *Plos. One.* 2007; 2 (4): e349
- ⁷⁰ Campabadal *et al.* Condiciones ambientales e iluminación. *Avicultura profesional.* 1985; 16 (4): 23.
- ⁷¹ Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000; 219 (7):907
- ⁷² Especificaciones Técnicas para la Producción, cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM-062-ZOO-1999. (revisada el 01.05.08) Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx>
- ⁷³ Di Trani L, Cordioli P, Falcone E; Lombardi G; Moreno A, Sala G, Tollis M. Standardization of an inactivated H7N1 Avian Influenza vaccine and efficacy against

A/chicken/Italy/13474/99 high-pathogenicity virus infection. *Avian Dis.* 2003; 47: 1042-1046.

⁷⁴ Swayne D, Lee C, Spackman E. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* 2006; 35 (2): 141-146.

⁷⁵ Ganapathy K, Todd V; Cargill P, Montiel E; Jones C. Interaction between a live avian pneumovirus vaccine and two different Newcastle disease virus vaccines in broiler chickens with maternal antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathol.* 2006; 35 (6): 429-434.

⁷⁶ Al-Natour M, Ward L, Saif Y, Stewart B, Keck L. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 2004; 48: 177-182.

⁷⁷ Sahin O, Zhang Q, Meitzler J, Harr B, Morishita T, Mohan R. Prevalence, antigen specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67 (9): 3951-3957.

⁷⁸ Lee C, Senne D, Suarez D. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian Influenza virus. *J. Virol.* 2004; (78) 15: 8372-8381

⁷⁹ Ascher M, Gottlieb A, Kirkpatrick C. Transfer Factor, Basic Properties and Clinical Applications. Academic Press. Inc. 1976; 633-640

⁸⁰ Valderrábano E, Pérez M, De la Fuente M, Vázquez S, Estrada S, Donis L, Flores L, Estrada I. Producción de anticuerpos en ratones BALB/c inmunizados con EDL^{ova}. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Inmunología 2008, mayo 20-24 Huatulco (Oaxaca) México. México (D.F.): Sociedad Mexicana de Inmunología A.C. 2008: 38

- ⁸¹ Brown D, Kawaoka Y, Webster R, Robinson H. Assessment of retrovirus-expressed nucleoprotein as a vaccine against lethal Influenza virus infections of chickens. *Avian Dis.* 1992; 36: 515-520.
- ⁸² Fynan E, Webster R, Fuller D, Haynes J, Santoro J, Robinson H. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 11478-11482.
- ⁸³ Jiang Y, Yu K, Zhang H, Zhang P, Li C, Tian G, *et al.* Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimizednHA gene in a pCAGGS plasmid vector. *Antiviral Res.* 2007; 75: 234-241.
- ⁸⁴ Van der Goot J, Koch G, de Jong M, Van Boven M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl. Acad.Sci.* 2005; (102) 50: 18141-18146.
- ⁸⁵ Hernandez SR. Análisis de la respuesta de anticuerpos de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* contra Diaciltrealosa (DAT) y Factor cuerda (CF) tratados con Factor de Transferencia. (tesis Grado Maestro en Ciencias con especialidad en inmunología) México (D.F.) México: IPN, 2007.
- ⁸⁶ Igietseme U, Eko O, He Q, Black M. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert. Rev. Vaccines.* 2003; 3:23-34.
- ⁸⁷ Valderrábano E, Pérez S, Serafín J, Estrada S, Estrada I. Expresión de citocinas y producción de anticuerpos en ratones BALB/c tratados con EDL. Memorias del 1er. Encuentro internacional sobre Factor de Transferencia “Sherwood Lawrence” 2006. Noviembre 24; México (D. F.): Proyecto Factor de Transferencia – Departamento de Inmunología ENCB, IPN. 2006: 30.

⁸⁸ Uribe LS. Inducción de la expresión de citocinas por el factor de transferencia aviar en células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas. (tesis de licenciatura) México (D.F.) México: FMVZ. UNAM, 2007.

⁸⁹ Bravo BA. IL2 E IFN γ : determinación de su expresión mediante la técnica de RT-PCR en pollos estimulados con Factor de transferencia específico para influenza aviar. (tesis de licenciatura) México (D.F.) México: FMVZ. UNAM, 2007.