

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON
HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 PARA VALORAR EL EMPLEO DEL EXTRACTO
DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANTONIO ALBERTO BRAVO BLAS

TUTORA:

LAURA COBOS MARÍN

COMITÉ TUTORAL:

MARÍA MASRI DABA
ROMMEL CHACÓN SALINAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F. 2009



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.

Se reconoce y agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Dedico este trabajo

A mis padres.

A Natalia Castaneira. Eres mi ejemplo de valentía, empuje, decisión, sensibilidad, calidad humana y esperanza en lo que parece imposible.

A mis queridos amigos: Claus, Gabriel, Gerardo/Sofía, Julio, Maru, Rodrigo Kanafany y Zaira. Son una maravilla.

Al Señor Mario Cruz por las anécdotas, por los chistes, por las pláticas de las chácharas, por los dulces, por radio unam, por Beethoven, por la ópera y por el jazz.

Agradecimientos

Es innegable que para terminar un trabajo como este, fue necesaria la colaboración de muchas personas, excelentes todas.

A mi Comité tutorial: María Masri y Rommel Chacón. Gracias por la confianza, los consejos y por la comprensión durante estos dos años.

A mis sinodales.

A Laura Cobos: Ha sido la mejor guía que pude encontrar, que me ha ayudado a desarrollar capacidades y lograr metas que antes creía inalcanzables.

A Humberto Ramírez y sus estudiantes: Francisco y Rebeca, que han sido mucho más que compañeros durante la maestría por la colaboración, las críticas, las propuestas y los ratos tan buenos que aligeraban los días más pesados.

Del laboratorio de Virología a Liliana Valdés, Rodrigo Téllez, José Manuel Saavedra, Miguel Jasso, Pablo Hernández y Paulina Álvarez por la atención que han puesto a mi trabajo y por todas las propuestas que han hecho para mejorarlo.

A Gisela Martínez por la asesoría y paciencia inmensas y a los técnicos del Departamento de Patología por su desinteresada labor en el procesamiento de las muestras.

De Posgrado a Araceli, Clarita, Elsa, Juan José, Marcela, Maru y Meche. Sin ustedes, los trámites habrían terminado conmigo.

De la ENCB, IPN a Marisol De la Fuente, Mayra Pérez y Jeanette Serafín por las facilidades otorgadas para poder completar este trabajo.

Y una vez más, a mi Facultad, a la que debo eterna gratitud.

“Mañana despertarás para darte cuenta que toda tu vida ha cambiado.
Aunque nada parezca diferente, una revolución tuvo lugar”

Jarvis Cocker.

RESUMEN

Se sabe que el Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) tiene prevalencia mundial y es capaz de establecer infecciones latentes. En diferentes países se han realizado varios experimentos para encontrar una manera eficaz de evitar la infección, presentación de lesiones así como la eliminación viral. En este trabajo se propuso la utilización terapéutica del extracto dializable de leucocitos (DLE) en un modelo murino de infección con EHV-1. Primero se logró aislar virus de campo a partir del macerado de tejidos de un feto equino abortado. Esto fue confirmado por inmunodifusión en gel de agar y por microscopía electrónica. Posteriormente se hizo una cinética de infección por vía intranasal (IN) y se encontraron lesiones tanto en pulmón como en hígado, las lesiones más severas se presentaron a los días 7 y 11 post infección (p. i.) y hubo diferencia entre grupos en la ganancia de peso ($p < 0.05$). Se hizo un nuevo ensayo administrando $2\mu\text{g}/\text{día}$ de DLE por 5 días iniciando al mismo tiempo que la infección con EHV-1. De aquí se notó una tendencia a la disminución en el número de muestras con neumonía intersticial y focos necróticos discretos en hígado ($p > 0.05$). Por último se comparó entre vías de infección intraperitoneal (IP) e intranasal y se observaron lesiones pulmonares y hepáticas independientemente de la vía utilizada, además de que nuevamente se encontraron diferencias entre el peso de los grupos ($p < 0.01$). La disminución en la presentación de lesiones a causa del DLE concuerda con modelos de herpes humano y tuberculosis. Es de interés ver el tropismo hepático del virus aislado, que puede estar relacionado con la cepa involucrada. Este trabajo sienta las bases para evaluaciones moleculares del papel inmunomodulador del DLE, utilizando un número mayor de animales.

Palabras clave: Extracto dializable de leucocitos, Herpesvirus equino tipo 1, modelo murino.

ABSTRACT

It is known that equine Herpesvirus-1 (EHV-1) is prevalent worldwide and is capable of establishing latent infection. In different countries many experiments have been performed in order to find an effective way to avoid infection, lesion appearing as well as viral shedding. Therapeutic usage of dialyzable leukocyte extract (DLE) in a murine model of infection with EHV-1 is proposed in this work. First, a field viral isolation from macerated tissues from an aborted fetus was achieved. This was confirmed by agar gel immunodiffusion and by electronic microscopy. Subsequently, an intranasal infection (IN) kinetics assay was performed where pulmonary and hepatic lesions were found with a peak at days 7 and 11 post infection (p. i.). as well as a difference in weight gain between groups ($p < 0.05$). A new assay was carried out administering $2\mu\text{g/day}$ of DLE for 5 days starting at the same time that the EHV-1 infection. The result was a tendency to decrease in the number of samples presenting interstitial pneumonia and mild hepatic focal necrosis ($p > 0.05$). Finally, a comparison of intraperitoneal (IP) and intranasal routes of infection was made where pulmonary and hepatic lesions were observed despite the route used as well as differences in weight gain among groups ($p < 0.01$). Decrease in the lesion appearance due to DLE administration agrees with human herpesvirus and tuberculosis models. It results interesting to observe the hepatic tropism from the isolated virus, which could be related to strain involved. This work sets the basis for further molecular evaluations of the immunomodulatory role of DLE using a greater number of animals.

Keywords: Dialyzable leukocyte extract, equine herpesvirus type 1, murine model.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Peso promedio diario de ratones infectados y sus testigos en la cinética intranasal, muestras tomadas a los días 3, 7, 11 y 15 p. i., y registro de signos clínicos aparentes durante las revisiones. H=hígado, P=pulmón, T=tráquea.....29

Cuadro 2. Lesiones histopatológicas presentadas en las diferentes muestras tomadas para la cinética intranasal. Nótese que la combinación de lesiones en hígado y pulmón fue a los días 7 y 11 p. i. En tráquea no se observaron lesiones en ningún momento, por lo que se descartó la toma de esta muestra para los experimentos siguientes.....31

Cuadro 3. Proporción de presentación de lesiones en los grupos (n=4) infectados (EHV-1) e infectados y tratados con DLE (EHV+DLE) a los días 7 y 11 p. i. H=hígado, P=pulmón.32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Membrana corioalantoidea inoculada con el macerado de órganos de un aborto sospechoso de la presencia de EHV-1. La flecha señala la presencia de una pústula aparente a los 5 días post-inoculación.....26

Figura 2. Cultivo de células MDBK inoculado con el macerado de las membranas corioalantoideas positivas a la lesión por EHV-1, fijadas y teñidas con cristal violeta. Pueden notarse los espacios carentes de células (placas) provocados por la presencia viral. Este efecto empezaba a notarse a partir de las 36 horas post-infección (aumento 40X).....26

Figura 3. Inmunodifusión doble en agar en la que se observan líneas de precipitación que confirman el aislamiento de EHV-1. 1: macerado directo de las muestras; 2: testigo positivo; 3: 1er pase en MDBK's; 4: 2º pase en MDBK's; 5: testigo positivo y 6: macerado de membranas con lesión. Pozo central: antisuero anti EHV-1.....27

Figura 4. Fotomicrografía electrónica que muestra un virión de EHV-1 libre en el citoplasma (flecha), que mide 250nm de diámetro. Aumento 50,000x.....28

Figura 5. Fotomicrografía electrónica de un núcleo infectado con EHV-1. Obsérvese la partícula viral (flecha) en migración en la cisterna perinuclear. Aumento 30,000x.....28

Figura 6. Mediciones diarias de peso en los ratones infectados y sus testigos desde el día 1 hasta el día 15 p. i. Obsérvese cómo el grupo infectado tiene una ganancia de peso menor a la del grupo testigo.....30

Figura 7. Variación en la ganancia diaria de peso entre los ratones infectados por vía intraperitoneal (IP), intranasal (IN) y sus testigos desde el día 1 hasta el día 14 p. i., ($P < 0.01$). Puede apreciarse que el grupo IN tuvo una ganancia de peso menor durante casi todo el experimento.....33

Figuras 8A-8C. Fotomicrografías que muestran engrosamiento intersticial en pulmones de ratones infectados con un aislamiento de campo de EHV-1. Las lesiones fueron observadas a los 15 días p. i. A) grupo i. n (10x); B) grupo i. p. (5x); C) testigo negativo (10x).....34

Figuras 8D-8G. Necrosis hepática focal (círculos) por EHV-1 en ratones infectados a los 15 días p. i. 8D: grupo i. n.; 8E: grupo i. p. (aumento de ambas: 10x); 8F: acercamiento que muestra cuerpo de inclusión intranuclear en una muestra del grupo i. p. (flecha); 8G: testigo negativo (aumento 10x).....35

ABREVIATURAS

µg. Microgramos.

µm. Micrómetros.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

CD. De sus siglas en inglés *cluster of differentiation*.

CTL. De sus siglas en inglés *cytotoxic lymphocytes*.

DLE. De sus siglas en inglés *dialyzable leucocitary extract*.

EHV-1. De sus siglas en inglés *equine herpesvirus type 1*.

EHV-2 a. De sus siglas en inglés *equine herpesvirus type 2 a*.

EHV-4. De sus siglas en inglés *equine herpesvirus type 4*.

ELISA. De sus siglas en inglés *enzyme linked immunosorbent assay*.

ENCB. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

EP. Embrión de pollo.

FT. Factor de transferencia.

g. Gramos.

gB. Glicoproteína B.

gC. Glicoproteína C.

gD. Glicoproteína D.

h. Hora.

IFN. Interferón.

IgA. Inmunoglobulina A.

IN. Intranasal.

IP. Intraperitoneal.

IPN. Instituto Politécnico Nacional.

Kda. Kilo daltons.

MCA. Membrana corioalantioidea.

MDBK. De sus siglas en inglés *Madin-Darby bovine kidney cells*.

MEM. Medio esencial mínimo.

mg. Miligramos.

MHC. De sus siglas en inglés *major histocompatibility complex*.

mL. Mililitro.

NOM. Norma oficial mexicana.

ORF 30. De sus siglas en inglés *open reading frame 30*.

p. i. Postinfección.

PBS. De sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*.

PCR. De sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*.

RPM. Revoluciones por minuto.

SFB. Suero fetal bovino.

Th. De sus siglas en inglés *T helper*.

TPB. Caldo triptosa fostatado.

UI. Unidades internacionales.

Introducción.....	3
Marco teórico.....	4
Características generales de la familia Herpesviridae.....	4
Características generales de EHV-1.....	6
Rinoneumonitis equina.....	7
Problemas neurológicos y aborto.....	7
Problemas neurológicos y aborto.....	8
Respuesta inmune a EHV-1 en el caballo.....	11
Respuesta de anticuerpos.....	12
Citocinas involucradas en la infección.....	12
Respuesta inmune celular.....	12
Modelo murino.....	13
Características del modelo murino.....	14
Extracto dializable de leucocitos (DLE).....	15
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	21
Material y métodos.....	22
Aislamiento viral.....	22
Identificación viral.....	23
Inmunodifusión doble en agar.....	23
Microscopía electrónica.....	23
Titulación viral.....	23

Experimento de cinética intranasal (IN).....	24
Evaluación del efecto inmunomodulador del DLE en los ratones infectados.....	24
Comparación entre vías intraperitoneal e intranasal.....	25
Resultados.....	26
Aislamiento viral.....	26
Identificación viral.....	27
Inmunodifusión doble en agar.....	27
Microscopía electrónica.....	27
Experimento de cinética intranasal (IN).....	28
Evaluación del efecto inmunomodulador del DLE en los ratones infectados.....	32
Comparación entre vía intraperitoneal e intranasal.....	32
Discusión.....	36
Conclusiones.....	40
Prospectivas.....	41
Referencias.....	42

Introducción

Han pasado más de 75 años desde el primer reporte de la infección por Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1 por sus siglas en inglés) que tuvo lugar en Lexington, Kentucky, Estados Unidos¹. Desde ese momento hasta la fecha se han logrado conocer muchos aspectos del virus y de la enfermedad que causa, pero de manera general se sabe que tiene prevalencia mundial y se puede manifestar en tres formas diferentes: respiratoria, conocida como rinoneumonitis, que afecta a caballos de cualquier edad; neurológica, en la que se puede observar desde disminución de la movilidad de la cabeza hasta la inmovilidad total, y reproductiva, que se presenta como mortinatos o abortos en el último tercio de gestación². Es necesario remarcar que ninguna de las presentaciones de la infección es excluyente de las demás.

Marco teórico

En caballos menores de 3 años de edad, la presentación clínica respiratoria se manifiesta como un padecimiento agudo y febril que se disemina rápidamente en toda la población presente. El virus primero infecta y se multiplica en células epiteliales de la mucosa respiratoria, para posteriormente infectar a varios tipos celulares como células endoteliales³, linfocitos⁴ y células dendríticas⁵. Es justo la infección de los linfocitos la responsable de la velocidad con la que el virus llega a sitios de replicación secundaria, como el útero⁶. Los signos de la infección se vuelven aparentes de 2-8 días posteriores a la exposición al virus y se presentan como fiebre, disminución del hambre, depresión y descarga nasal. Aunque la mortalidad derivada de una complicación por rinoneumonitis es rara y la recuperación completa del caballo sucede en 1 o 2 semanas, la infección por EHV-1 es una causa frecuente de interrupciones en los calendarios de entrenamiento o competencia, además del riesgo de un aborto subsecuente o enfermedad del sistema nervioso central⁷.

Características generales de la familia Herpesviridae

Se trata de virus grandes, con ADN de doble cadena y genoma dentro del rango de 125-235 mil pares de bases (kpb). Una propiedad que tienen en común todos los miembros de esta familia es la capacidad de persistir indefinidamente en sus hospederos, ya que establecen infecciones latentes que pueden llevar a la presentación recurrente de signos⁸. Los signos producidos por cada virus miembro de la familia se deben predominantemente al tipo de células en las que se replica y establece la latencia, como es el caso de la linfopenia marcada en los caballos infectados con EHV-1⁹.

Hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo de replicación específico para EHV-1, sin embargo, uno muy conocido es el del virus del herpes simple (HSV) que también pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, y es a partir de éste del que se dará un panorama acerca de la réplica viral como lo describen Whitley y colaboradores¹⁰:

Después de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, la cápside es liberada en el citoplasma y es transportada a través de los microtúbulos de tubulina gracias al complejo de proteínas motoras dinein/dinactin¹¹. Después la cápside se une a los poros nucleares, evento que supone una pérdida concomitante de su material genético mediante la acción de la importina- β ¹². Finalmente ocurre una “circularización” del genoma viral¹³.

La síntesis de ARN como de proteínas toma lugar en tres periodos secuenciales. El primero de ellos consiste en 6 proteínas conocidas como proteínas tempranas inmediatas, también denominadas α -proteínas. De éstas, 5 son las que regulan el ciclo reproductivo viral y el sexto se encarga de bloquear la presentación de péptidos antigénicos en la superficie de células infectadas, además de que son esenciales para la síntesis del segundo conjunto de productos virales, las β o proteínas tempranas. Casi todas estas proteínas se encargan del metabolismo de los ácidos nucleicos y se han vuelto el blanco de muchos fármacos antivirales. Por último, el tercer grupo es casi exclusivo para los componentes estructurales, tales como cápside, tegumento y envoltura virales. Es en el ensamblaje viral donde se forma la procápside a partir de proteínas andamio y de cápside. Las proteínas andamio tienen una proteasa unida a su sustrato durante el ensamblaje de la cápside, así el ADN recién sintetizado se empaca dentro de los viriones. A partir de este momento, las cápsides que contienen ADN se adhieren a la superficie nuclear por su membrana interna, son rápidamente envueltos y liberados al espacio situado entre las membranas interna y externa nucleares. Por último, los viriones viajan en vesículas transportadoras a través del aparato de Golgi hacia el espacio extracelular.

Características generales de EHV-1

El EHV-1 tiene en total ocho miembros clasificados en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, donde se encuentran los virus tipo 1, 3 y 4; la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, que cuenta con los tipos 2 y 5 y una tercera subfamilia denominada *Betaherpesvirinae*¹⁴. De todos estos, los tipos 1 y 4 tienen la mayor importancia desde los puntos de vista de prevalencia, clínico y económico¹⁵. En este trabajo se tratará exclusivamente con EHV-1. Se sabe que este virus puede causar enfermedad respiratoria en animales jóvenes, aborto en yeguas y enfermedad neurológica. Además, se calcula que aproximadamente el 80% de los caballos pueden presentar un estado de latencia viral¹⁶.

Actualmente la mejor estrategia que se ha utilizado para controlar la enfermedad es la vacunación junto con el manejo adecuado de los animales¹⁷. En México es común la vacunación de los caballos mayores de 3 años cada 3 o 4 meses con vacunas de virus inactivado, a diferencia de las hembras gestantes, que generalmente se inmunizan a los 5, 7 y 9 meses de gestación, lo que evidencia la protección limitada en efectividad y duración, a pesar de los años que se le han dedicado a la búsqueda de un medio efectivo de control de la infección.

Rinoneumonitis equina

Se trata de la presentación más común en caballos adultos. Los signos característicos de los animales con esta enfermedad son: fiebre, anorexia, descarga nasal y ocular, además de complicaciones bacterianas secundarias¹⁸. Los caballos se pueden infectar en repetidas ocasiones tanto por EHV-1 como EHV-4 a lo largo de su vida, pero por lo general la presentación de la enfermedad es cada vez más leve¹⁵. El primer sitio de

replicación viral se da en las células epiteliales, así como en los linfonodos regionales⁵, resultando en una viremia asociada a leucocitos³.

Problemas neurológicos y aborto

Se considera que ambas formas son consecuencia de la viremia asociada a leucocitos, ya que se continúa la replicación en las células que recubren el endotelio de los vasos sanguíneos, tanto en el sistema nervioso como en el útero gestante^{3, 15}.

En el caso específico del aborto, se sabe que puede ocurrir desde los 5 meses de gestación, pero es más común entre los 8 meses y la fecha terminal. Se ha observado que los mecanismos involucrados incluyen la infección de células endoteliales y trombosis uterina¹⁹. Después de una infección generalizada de los vasos del endometrio sucede una vasculitis severa además de una necrosis multifocal que puede resultar en el aborto de un feto negativo a la presencia de EHV-1^{20, 21}. Por otro lado, si las lesiones vasculares son menos extensivas, puede haber una transferencia viral focal a través de la barrera placentaria y de este modo abortar un feto infectado²². Si la infección fetal sucede en una fecha cercana al parto, puede nacer un potro infectado que usualmente muere pocos días después. Se sabe que hasta el 95% de los abortos ocurren en el último tercio de la gestación^{23, 24}.

En lo que respecta a la presentación neurológica, se puede clasificar como mieloencefalopatía, aunque puede variar desde una ataxia leve hasta paraplejia²⁵. En trabajos recientes basados en análisis histopatológicos, se ha observado que los signos presentados son resultado de infección de células endoteliales o complejos inmunes, isquemia, hemorragia e inflamación del parénquima neuronal, específicamente de las neuronas, células gliales, ependimales y microcapilares, desencadenando una vasculitis cerebroespinal acompañada de trombosis^{3, 26, 27}.

Además de todo esto, trabajando con aislamientos virales de diferentes regiones del mundo, se ha reportado que el cambio en un solo aminoácido de la ADN polimerasa codificada en el marco de lectura abierto 30 (ORF 30), está fuertemente asociado con el brote de enfermedades neuropatogénicas y no neuropatogénicas²⁸. Por su parte, en el estudio de Allen y Breathnach²⁹ (2006) se reportó que la mutación en el ORF30 puede estar relacionada con la alta intensidad y larga duración de la viremia asociada a leucocitos, lo que lleva a un mayor riesgo del desarrollo de signos neurológicos en caballos infectados con EHV-1. Y aunque se considera que EHV-1 no es capaz de infectar células de tejido nervioso, se han llevado a cabo estudios en los que se ha logrado infectar neuronas de ratón, independientemente de si la cepa correspondía a un tipo neurológico o no³⁰. Esto genera una nueva ruta en las posibles investigaciones acerca de EHV-1.

Panorama breve de la vacunación contra EHV-1

Durante casi 30 años se han llevado a cabo varios estudios para probar la efectividad de las vacunas que actualmente se encuentran en el mercado ya que mucho se comenta acerca de la poca efectividad de éstas contra el EHV-1. Esta idea es apoyada por los esquemas de vacunación que incluyen tres aplicaciones al año en animales jóvenes o incluso cuatro en los casos de yeguas gestantes. A continuación se presentan los hallazgos de varios trabajos que fueron hechos para evaluar y caracterizar la acción de los inmunoproliféricos:

Desde la década de 1940 se inició con la aplicación de vacunas por vía intramuscular a yeguas gestantes. El origen de estas vacunas era virus propagado en cultivo celular e inactivado o bien, virus vivo adaptado a hámster³¹. Desafortunadamente no se obtuvieron los resultados deseados, excepto con la inoculación intranasal en potros, que un mes después fueron desafiados y no presentaron la enfermedad. Así se

continuó durante varios años, hasta 1966, cuando Pette³² a partir de un feto abortado (aislamiento denominado RAC-H), adaptó un virus por medio de pases en hámsteres, seguido por 80 pases en células de riñón de cerdo y 176 pases en células de riñón de conejo. Este nuevo virus altamente adaptado crecía poco en otros tipos celulares, pero conservó algo de inmunogenicidad tanto en caballos como en hámsteres. La aplicación repetida por vía intramuscular causó fiebre difásica pero patogenicidad y contagio disminuidos en 7100 potros y yeguas gestantes con la presentación de sólo 7 abortos. Fue a partir de la década de 1970 que la vacuna elaborada con esta cepa se empezó a comercializar como Rhinomune[®] y así hasta la fecha en los países que permiten la aplicación de virus atenuado. En 1978, esta vacuna fue sometida a pruebas para evaluar su efectividad contra el aborto³³. Los resultados de este experimento no fueron concluyentes, aunque hoy en día se sigue utilizando la vacuna en los Estados Unidos en hembras gestantes sin que se haya comprobado la prevención de abortos. El mismo año, Bryans propuso la utilización de un virus inactivado químicamente (actualmente llamado Pneumabort K) que podría ser aplicado por vía intramuscular y sobre todo, que había demostrado una protección contra el aborto y disminución en la eliminación viral³⁴. Sobre la seguridad y eficacia de esta vacuna se hizo un trabajo³⁵, desafortunadamente tampoco se obtuvieron todos los datos deseados. Posteriormente, Burrows y colaboradores³⁶ demostraron que si bien la vacunación reducía la viremia en *ponies* gestantes, no mostraba diferencia en la presentación de abortos entre las yeguas infectadas y sus testigos. Así se probó con otra vacuna de virus atenuado sin que tampoco se demostrara que se protegía del aborto a las yeguas³⁷.

Posteriormente, Hannant y colaboradores demostraron en 1993 que mediante la vacunación con complejos inmunes estimulantes o con virus inactivado se logra alcanzar un título de anticuerpos virus-neutralizantes de hasta 1×10^3 . Si bien este título no impidió la infección, sí redujo la cantidad y la duración de la eliminación

[®] Pfizer Animal Health, New York, USA.

viral desde la faringe³⁸, haciendo énfasis en que este hallazgo es importante en la protección de la población.

En un artículo de 2001, Heldens y colaboradores³⁹ mostraron la evidencia de prevención de la enfermedad respiratoria en potros, aunque no hubo efecto significativo en el desarrollo de viremia asociada a células. En los últimos años se ha propuesto el uso de vectores que expresan glicoproteína B, C o D (gB, gC o gD).

Estos resultados dejan de manifiesto que la vacuna ideal que pueda estimular la producción de anticuerpos virus-neutralizantes y una actividad citolítica, aún no se ha logrado producir. En la revisión de 2006, Kydd y colaboradores concluyen que la próxima generación de vacunas necesitará un nuevo sistema de presentación de antígenos inmunodominantes y que además sean favorecidos por un adyuvante⁴⁰.

Respuesta inmune a EHV-1 en el caballo

El objetivo primario de la respuesta inmune es proteger de la infección, cuestión que se ha intentado intensivamente con la vacunación, y de manera secundaria es deseable que el huésped pueda tener una respuesta de anamnesis eficiente⁴⁰. La diseminación del virus se da por contacto directo o por medio de fomites. Kydd y colaboradores⁴⁰ mencionan que en un principio se pensaba que la infección se daba en el momento del destete, debido a la disminución de los niveles de anticuerpos neutralizantes en lo potros; sin embargo, ahora se sabe que la infección, aunque subclínica, puede darse antes del destete⁴¹.

Desde la década de 1960 se sabe que la duración de la inmunidad por vacunación a la enfermedad respiratoria es de 3-6 meses⁴² y más recientemente se ha obtenido evidencia de que, de manera experimental, en la presentación abortiva el periodo inmune puede ser hasta de un año⁴³.

El sitio de replicación primaria es el tracto respiratorio superior y se ha demostrado experimentalmente la presencia del antígeno viral en linfonodos asociados con el tracto respiratorio a las 12 horas postinfección, en cepas de alta virulencia^{5,44}. Scott y colaboradores⁴⁵ consideran que es justo la infección de los linfocitos la responsable de la rápida diseminación viral a sitios secundarios, incluyendo al útero gestante y la médula espinal. Además, se sabe que aunque el ADN viral puede ser encontrado en todas las subpoblaciones leucocitarias, la expresión del antígeno viral se ha detectado principalmente en CD8⁺, seguido por CD4⁺ y en sólo unos pocos monocitos⁴⁶, mientras que no se expresó en linfocitos B ni en neutrófilos durante la fase virémica aguda.

Respuesta de anticuerpos

Mediante las pruebas de fijación de complemento y virus neutralización, se han reportado seroconversiones que inician desde las 2 semanas después de la infección con virus de campo y de forma experimental. De estos anticuerpos, los responsables de neutralizar al EHV-1 son de larga duración (incluso más de un año), son específicos de tipo y principalmente dirigidos contra las glicoproteínas B (gB) y C (gC)⁴⁷. Por el contrario, los anticuerpos fijadores del complemento son de corta vida, volviéndose indetectables a los 3 meses postinfección. Se considera que la detección de estos anticuerpos es útil para que con la toma de muestras pareadas se pueda detectar una infección reciente; sin embargo, la gran desventaja de estos anticuerpos es su reacción cruzada entre EHV-1 y EHV-4⁴⁸. Debido a que la infección primaria sucede en la mucosa respiratoria, se espera que el isotipo principal de anticuerpos sea IgA⁴⁹.

Citocinas involucradas en la infección

Se ha detectado la expresión de interferones tipo 1 (IFN- α y β) en secreciones nasales y en suero durante los 10 días postinfección experimental⁵⁰. En lo que respecta a IFN- γ , se ha demostrado que se incrementa su expresión por parte de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a los 10 días posteriores a la infección con EHV-1⁵¹. Hasta el momento de la realización de esta revisión de literatura sólo estas dos citocinas han sido evaluadas en el caballo.

Respuesta inmune celular

En varios estudios se ha evaluado el nivel de proliferación de los linfocitos equinos^{52, 53}. Lo que se ha observado es que si estos linfocitos son estimulados con el virus inactivado se incrementa su proliferación antígeno-específica, aunque existen variaciones de sus cinéticas entre las diferentes cepas existentes. Por el contrario, en los casos de linfocitos colectados de animales infectados con cepas virulentas, éstos no responden de manera óptima a la estimulación por mitógenos o por virus inactivado durante periodos de entre 2 y 10 semanas, lentamente se recuperan y regresan a su nivel basal aproximadamente tres meses después⁵⁴. Otra observación muy interesante es que aquellos linfocitos provenientes de caballos infectados con virus activo, entran en anergia al ser nuevamente estimulados con el agente activo. Dichas características en el comportamiento del EHV-1 junto con otras en ensayos *in vitro*, tales como la infección y replicación dentro de células dendríticas⁵⁵, además de la regulación negativa de la molécula del MHC de clase I en células infectadas, resultan de gran utilidad para comprender el comportamiento viral en algunos mecanismos de evasión de la respuesta inmune^{56, 57}.

Adicionalmente, Kydd y colaboradores^{5, 44, 58}, han realizado varios experimentos y han podido concluir que a las pocas horas de haber entrado el virus al organismo se vuelve intracelular, un mecanismo más de evasión inmune, y que después de la infección se incrementan las poblaciones de CD8⁺ tanto en sangre como en pulmón.

Modelo murino

Debido a que la implementación de un modelo experimental en caballos es complicada por aspectos como el manejo, costo y el control de variables medioambientales, algunos grupos de investigadores han logrado adaptar modelos

murinos de infección con EHV-1 con diferentes cepas de ratones⁵⁹, en diferentes condiciones⁶⁰ y con evaluaciones enfocadas a entender la interacción virus-hospedador^{61, 62, 63}.

Características del modelo murino

En general se puede considerar al ratón como un buen modelo de infección, ya que presenta varias de las características propias de la enfermedad en el caballo⁶¹, aunque no se ha reportado que haya infección entre ratones. En cuanto al tropismo del virus en esta especie, se ha reportado aislamiento viral a partir de cornetes nasales, tráquea, pulmones, bulbo olfatorio, cerebro, ojo y raramente ha sido encontrado en hígado, bazo, nódulos linfáticos cervicales, adrenales, corazón, riñón o páncreas^{61, 64, 65, 66, 67} y en el caso de hembras gestantes se ha aislado de placenta, útero y fetos^{68, 69, 70}. Otra característica compartida del modelo murino con el hospedero natural es que el feto abortado o la placenta pueden resultar negativas a la presencia viral⁶⁹.

Los signos clínicos presentes en ratones infectados incluyen: polipnea o disnea, depresión, deshidratación, pelo hirsuto, postura encorvada, y en menor frecuencia conjuntivitis. Todos los signos aparecen dentro de los 12 días post infección (p. i.)^{61, 64, 70}. También se ha reportado disminución de peso con su recuperación hasta 12 días p. i. y disminución de la temperatura rectal durante los primeros dos días posteriores a la infección^{67, 70, 71}, aunque la presentación y gravedad de los signos está directamente relacionada con la cepa viral y la dosis recibida^{61, 66, 72, 73}.

Extracto dializable de leucocitos (DLE)

Son péptidos de bajo peso molecular⁷⁴, termolábiles pero muy estables en congelación, que tienen la propiedad de inducir la activación de la respuesta inmune en receptores no inmunizados, fueron descritos por primera vez y denominados factor de transferencia en 1949 por Sherwood Lawrence⁷⁵. Actualmente estos péptidos se denominan extractos dializables leucocitarios (DLE). Desde aquellos años se ha trabajado con el DLE, comprobando los diversos efectos sobre la respuesta inmune, aunque hasta la fecha no se ha podido dilucidar el o los mecanismos por los cuales se logren dichos efectos. Esto ha dado pie a que los trabajos con DLE causen controversia polarizando la opinión entre quienes se encuentran a favor y quienes no. A continuación se explicarán las definiciones básicas y se mencionarán algunos de los hallazgos relacionados directamente con el DLE.

El origen del DLE es la capa leucoplaquetaria de una muestra sanguínea o de esplenocitos. Se toma esta porción celular, se lisa mediante varios ciclos de congelación-descongelación y posteriormente se pasa a través de una membrana de diálisis. Así el producto filtrado contendrá los péptidos denominados DLE.

Anteriormente se manejaban los términos DLE y factor de transferencia (FT) de manera indistinta, ya que se pensaba que contenían un solo tipo molecular, pero ahora se sabe que una de las diferencias entre el DLE y el FT es el tamaño de las moléculas que pasan a través de las membranas: El DLE es de hasta 10 Kda, mientras que el tamaño del FT es menor a 5 Kda; además es antígeno específico, a diferencia del efecto inespecífico del DLE^{76, 77, 78, 79}. La capacidad de reacción antígeno-específica quedó demostrada en el experimento de Kirkpatrick y colaboradores⁸⁰ en el que se tomó el FT proveniente de ratones sensibilizados a la ferritina. Posteriormente se puso en contacto al FT con la ferritina y finalmente se recuperó

nuevamente el FT que no se había fijado y fue inoculado en otro grupo de ratones no sensibilizados. El resultado fue que la transferencia de la reacción de hipersensibilidad tardía se había perdido.

Desde sus inicios hasta la actualidad se ha mantenido la investigación en varios países en lo que respecta al efecto del DLE. En México, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas ha sido la pionera en la investigación y utilización del DLE⁸¹, y hasta ahora el papel de éste extracto como inmunomodulador ha sido ampliamente demostrado en humanos^{82, 83, 84} de forma clínica como único tratamiento, así como combinado con varios fármacos para distintas enfermedades infecciosas como tuberculosis; también se ha usado de manera experimental en modelos animales donde se notó que los animales tuberculosos que recibieron el FT presentaron una restauración de la expresión de las citocinas tipo Th₁, TNF- α y aumento de la respuesta DTH. Para el caso de herpes simple se ha utilizado el DLE de manera profiláctica en un modelo murino, con el resultado del incremento en la expresión de IFN- γ por periodos prolongados y disminución en el tiempo de recuperación⁸⁵. En el área veterinaria su aplicación ha sido menor aunque con resultados favorables para la mayoría de los modelos experimentales^{86, 87, 88}. Uno de los efectos del DLE *in vitro* es la inducción de la expresión de IFN- γ , citocina que además de activar diversas poblaciones celulares induce la diferenciación de los linfocitos cooperadores al perfil Th₁, que es muy importante en el control de infecciones por agentes intracelulares^{81,89}.

Anteriormente se había definido una dosis como el producto obtenido de la diálisis de 5×10^8 células⁷⁴ aunque esto ha cambiado y hoy en día se dosifica con base en la cuantificación de péptidos.

Otra característica importante que se ha descrito del DLE es la capacidad de ser utilizado interespecie. Esto ha sido demostrado por Fudenberg y Pizza en 1993⁹⁰ y

posteriormente en 2005 por Franco-Molina y colaboradores, donde se demuestra que el DLE de origen bovino favorece la sobrevivencia en ratones con choque endotóxico⁹¹.

Debido a todo lo anterior y a que en países como Estados Unidos, Inglaterra, Australia y Argentina⁹² se llevan varios años abordando estudios acerca de este virus, se ha propuesto el uso de inmunoestimuladores^{93, 94} para compensar las deficiencias en cuanto a protección.

Justificación

Con base en los antecedentes expuestos el presente estudio se enfocó la estandarización de un modelo murino de infección experimental con EHV-1 para que posteriormente se pueda hacer una evaluación sobre el efecto del DLE en la presentación de signos clínicos, lesiones histopatológicas y carga viral, así como de la modulación de la respuesta inmune.

Hipótesis

La administración terapéutica del extracto dializable de leucocitos (DLE) en ratones infectados con herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) disminuirá la presentación de signos y las lesiones histopatológicas en los órganos del aparato respiratorio.

Objetivo general

Estandarizar un modelo murino de infección con EHV-1 para evaluar si la administración de DLE evita o disminuye la manifestación de signos y lesiones histopatológicas en ratones infectados experimentalmente.

Objetivos particulares

1. Aislar virus de campo a partir de muestras de fetos equinos abortados, sangre y placentas de yeguas con signos sugerentes a la enfermedad, para emplearlo en un modelo murino de infección.
2. Estandarizar el modelo murino de infección mediante la adaptación del virus de campo al ratón, para observar la presentación de signos y lesiones histopatológicas.
3. Realizar una cinética de la presentación de lesiones histopatológicas haciendo tomas a diferentes tiempos postinfección para determinar el punto crítico de afectación orgánica en los ratones.
4. Evaluar el efecto del DLE sobre la presentación de signos y lesiones en ratones infectados experimentalmente con EHV-1 mediante su aplicación terapéutica, para valorar su uso como inmunomodulador.

Material y métodos

Todos los procedimientos que involucran manejo con animales vivos se llevaron a cabo con apego a la NOM-062-ZOO-1999⁹⁵. Se utilizó un total de 58 ratones Balb/c para los experimentos.

Aislamiento viral

Se colectaron muestras de pulmón, hígado y tráquea a partir de abortos provenientes de 2 diferentes criaderos en el Estado de México desde diciembre de 2007. Todas las muestras colectadas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

A partir de una mezcla de todos los órganos fetales, se hizo un macerado y se centrifugó a 3000 RPM por 5 minutos. Posteriormente se tomó el sobrenadante y se le adicionaron 75 UI/mL de penicilina/100µg/mL de estreptomicina. Se inocularon 0.2 mL en membrana corioalantoidea (MCA) de embrión de pollo (EP) de 9-11 días de edad, fueron mantenidos en incubación a 37°C y se revisaron diariamente en busca de mortalidad. A los 5 días se sacrificaron mediante refrigeración y se cosecharon las membranas. Tanto las membranas con lesión como las que no la presentaron fueron colectadas y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

A las membranas que presentaron lesión se les hizo un pase en células MDBK. Éste cultivo celular fue mantenido con medio esencial mínimo (MEM) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se congelaron, se centrifugaron a 300 rpm por 10 minutos y del sobrenadante se hicieron alícuotas que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Identificación viral:

Inmunodifusión doble en agar:

El macerado de las membranas con lesión se sometió a una inmunodifusión doble en agar, enfrentándolo con anticuerpos específicos contra EHV-1 y de la misma forma se enfrentó la muestra contra anticuerpos contra EHV-2 para asegurar que no hubiera alguna reacción cruzada.

Microscopía electrónica:

Para confirmar el aislamiento se tomó una sección de membranas que presentaba engrosamiento, se incluyó en glutaraldehído al 2.5% y se envió al microscopio electrónico del Departamento de Patología de la Facultad para su análisis.

Titulación viral

Se sembraron células MDBK en una placa de 96 pozos, para hacer la titulación viral: se hicieron diluciones décuples seriadas hasta 10^{-8} con cuatro repeticiones por dilución y el título se calculó por el método de Reed y Muench, tomando como punto final la dilución en la que hubo efecto citopático en el 50% de los pozos infectados y se expresaron en $DICC_{50\%}/mL$.

Experimento de cinética intranasal (IN)

Este experimento se hizo con 12 ratones ratones Balb/c machos de 4 a 6 semanas de edad infectados con el aislamiento de EHV-1 con un $1 \times 10^{4.58}$ DICC_{50%}/mL. Los ratones fueron tranquilizados con ketamina a 100 mg/kg por vía intramuscular. Posteriormente se sacrificaron a los días 3, 7, 11 y 15 post inoculación (p. i.) y se tomaron muestras de hígado, pulmón, tráquea que fueron divididas en dos partes, una para macerar y otra más pequeña para incluir en formol al 10% y hacer un análisis histopatológico. Se registró el peso de los ratones y se buscó la presencia de signos clínicos diariamente hasta el día 15 p. i.

Durante el experimento los animales se mantuvieron dentro de la unidad de aislamiento del animalario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, en jaulas con filtros de aire y con cama de aserrín, alimento y bebida estériles *ad libitum* y periodos luz/oscuridad natural.

Evaluación del efecto inmunomodulador del DLE en los ratones infectados

La presencia/ausencia de lesiones en la muestras fue considerada como indicador del efecto inmunomodulador. Para este ensayo se formaron 4 grupos: Infectados con EHV-1, infectados intranasalmente (IN) y tratados con DLE, testigo de EHV-1 (PBS) y testigo de DLE. Las muestras se tomaron a los días 7 y 11 p. i. para hacer el análisis histopatológico y el reaislamiento viral a partir de pulmón, tráquea e hígado. Los animales se revisaron diariamente en busca de los signos referidos por otros trabajos⁶³. El DLE utilizado fue de origen murino, lote MP/M-BAC/NE/NO₁, con una concentración de 104 µg/mL y fue proporcionado por el personal del laboratorio de Inmunología de la ENCB, IPN. La cantidad de DLE recibido por los ratones fue de 2

μg de péptidos por vía intraperitoneal (IP) y les fue administrado por 5 días cada 24 horas a partir del día cero.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza para determinar si se presentaban diferencias entre los grupos.

Comparación entre vías intraperitoneal e intranasal

Debido al hallazgo de lesiones hepáticas en las ratones, se trabajó con tres grupos ratones Balb/c machos de aproximadamente 7 semanas de edad. Cada grupo de 6 animales. Se centrifugó el inóculo a 5000g/30 min en un tubo Amicon® para concentrar el virus. El botón obtenido se resuspendió en 1 mL de MEM y por último se filtró con una membrana con tamaño de poro de 0.45 μm para garantizar la esterilidad. Posteriormente se inocularon 6 ratones previamente tranquilizados con ketamina. Se probaron 2 vías de inoculación: intraperitoneal (IP) e intranasal (IN). Los testigos fueron inoculados con MEM únicamente. A partir de ese momento se hicieron observaciones diarias en busca de signos clínicos hasta alcanzar el día 14 p. i.

Resultados

Aislamiento viral

A partir de las muestras tomadas de uno de los abortos se logró la adaptación viral a embrión de pollo, en los que se presentaron lesiones pustulares (figura 1). Posteriormente se logró una primera adaptación a la línea celular MDBK (figura 2).

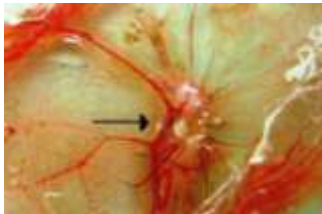


Figura 1. Membrana corioalantoidea inoculada con el macerado de órganos de un aborto sospechoso de la presencia de EHV-1. La flecha señala la presencia de una pústula aparente a los 5 días post-inoculación.

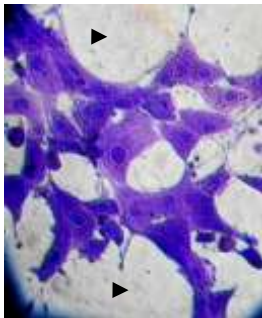


Figura 2. Cultivo de células MDBK inoculado con el macerado de las membranas corioalantoideas positivas a la lesión por EHV-1, fijadas y teñidas con cristal violeta. Pueden notarse los espacios carentes de células (puntas de flecha) provocados por la presencia viral. Este efecto empezaba a notarse a partir de las 36 horas post-infección (aumento 40X).

Identificación viral:

Inmunodifusión doble en agar:

A continuación se muestra la imagen del gel de agarosa con la línea de precipitación positiva a EHV-1 de campo y su identidad total con el testigo positivo, correspondiente al virus vacunal (figura 3).



Figura 3. Inmunodifusión doble en agar en la que se observan líneas de precipitación que confirman el aislamiento de EHV-1. 1: macerado directo de las muestras; 2: testigo positivo; 3: 1er pase en MDBK's; 4: 2º pase en MDBK's; 5: testigo positivo y 6: macerado de membranas con lesión. Pozo central: antisuero anti EHV-1.

Microscopía electrónica:

Las fotomicrografías muestran la presencia de EHV-1 tanto en citoplasma (figura 4), como en la cisterna perinuclear, aparentemente adquiriendo su envoltura (figura 5).

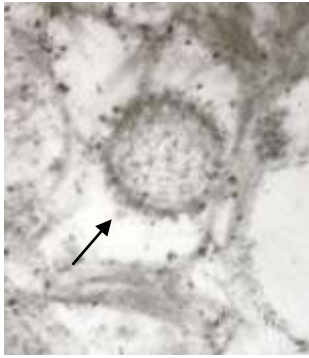


Figura 4. Fotomicrografía electrónica que muestra un virión de EHV-1 libre en el citoplasma (flecha), que mide 250nm de diámetro. Aumento 50,000x.



Figura 5. Fotomicrografía electrónica de un núcleo infectado con EHV-1. Obsérvese la partícula viral (flecha) en migración en la cisterna perinuclear. Aumento 30,000x.

Experimento de cinética intranasal (IN)

Los pesos registrados y la toma de muestras se encuentran en el cuadro 1. Existe una diferencia de peso estadísticamente significativa entre el grupo testigo y el infectado ($P < 0.05$). Las lesiones se encuentran resumidas en el cuadro 2, en el que se nota neumonía intersticial y necrosis hepática. La severidad de las lesiones fue discreta pero se mostró un pico a los días 7 y 11 p. i. En tráquea no se observaron lesiones en ninguna de las muestras, por lo tanto se descartaron para los experimentos siguientes. No se encontraron signos de la enfermedad durante los días de observación (figura 6).

Día p. i.	Peso infectados (g)	Peso testigos (g)	Toma de muestras	Signos clínicos
1	17.49			Pelo hirsuto ++
2	16.96	17.67		Pelo hirsuto +
3	17.59	17.82	H, P, T	pelo hirsuto +, nerviosismo
4	18.15	18.4		
5	18.52	18.93		
6	17.96	18.35		
7	18.57	18.86	H, P, T	
8	18.44	18.42		nerviosismo +
9	18.73	19.25		
10	18.58	18.67		nerviosismo +, pelo hirsuto +
11	18.8	19.05	H, P, T	
12	18.28	18.97		
13	18.63	20.57		
14	18.56	20.7		
15	19.05	20.03	H, P, T	

Cuadro 1. Peso promedio diario de ratones infectados y sus testigos en la cinética intranasal, muestras tomadas a los días 3, 7, 11 y 15 p. i., y registro de signos clínicos aparentes durante las revisiones. H=hígado, P=pulmón, T=tráquea.

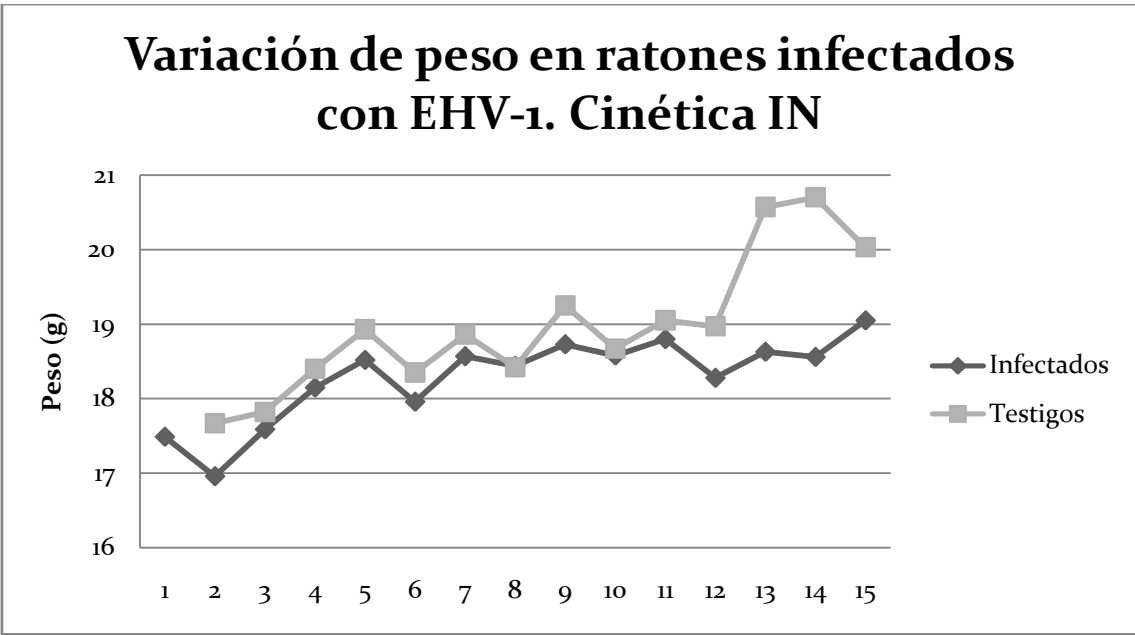


Figura 6. Mediciones diarias de peso en los ratones infectados y sus testigos desde el día 1 hasta el día 15 p. i., ($P < 0.05$). Obsérvese cómo el grupo infectado tiene una ganancia de peso menor a la del grupo testigo.

<i>Día</i>	<i>Tejido</i>	<i>Lesiones</i>
3	Hígado	Un foco necrótico discreto
	Pulmón	Sin lesiones
	Tráquea	Sin lesiones
7	Hígado	Necrosis discreta multifocal
	Pulmón	Congestión ligera
	Tráquea	Sin lesiones
	Hígado	Focos necróticos más grandes
11	Pulmón	Congestión ligera
	Tráquea	Sin lesiones
	Hígado	Necrosis individual
15	Pulmón	Sin lesiones
	Tráquea	Sin lesiones

Cuadro 2. Lesiones histopatológicas presentadas en las diferentes muestras tomadas para la cinética intranasal. Nótese que la combinación de lesiones en hígado y pulmón fue a los días 7 y 11 p. i. En tráquea no se observaron lesiones en ningún momento, por lo que se descartó la toma de esta muestra para los experimentos siguientes.

Evaluación del efecto inmunomodulador del DLE en los ratones infectados

Al día 7 p. i., un animal del grupo 1 (EHV-1) presentó neumonía intersticial (1/4 muestras) y focos necróticos hepáticos en 3, uno de ellos con infiltrado neutrofilico; en el grupo 2(EHV-1+DLE) no hubo necrosis hepática en ninguna muestra y se presentó neumonía intersticial en 1; los grupos 3 y 4 (testigos) no presentaron lesiones. Al día 11 el grupo 1 mostró necrosis hepática multifocal discreta (1/4) y todos los pulmones con engrosamiento discreto de septos alveolares; el grupo 2 no presentó necrosis hepática y 2 de 4 pulmones tuvieron engrosamiento ligero de septos alveolares, los grupos 3 y 4 no presentaron lesiones. Los datos sintetizados se muestran en el cuadro 3.

<i>Día</i>	<i>Muestra</i>	<i>EHV-1</i>	<i>EHV+DLE</i>	<i>Testigos</i>
7	H	3/4	0/4	Sin alteraciones
	P	1/4	1/4	Sin alteraciones
11	H	1/4	1/4	Sin alteraciones
	P	4/4	2/4	Sin alteraciones

Cuadro 3. Proporción de presentación de lesiones en los grupos (n=4) infectados (EHV-1) e infectados y tratados con DLE (EHV+DLE) a los días 7 y 11 p. i. H=hígado, P=pulmón. P>0.05.

Comparación entre vía intraperitoneal e intranasal

Se notó una diferencia altamente significativa en la ganancia de peso entre los cuatro grupos (P<0.01), aunque en ninguno de los grupos se notó la presencia de signos clínicos (figura 7).

Comparación de peso entre ratones infectados con EHV-1 por vía IP e IN

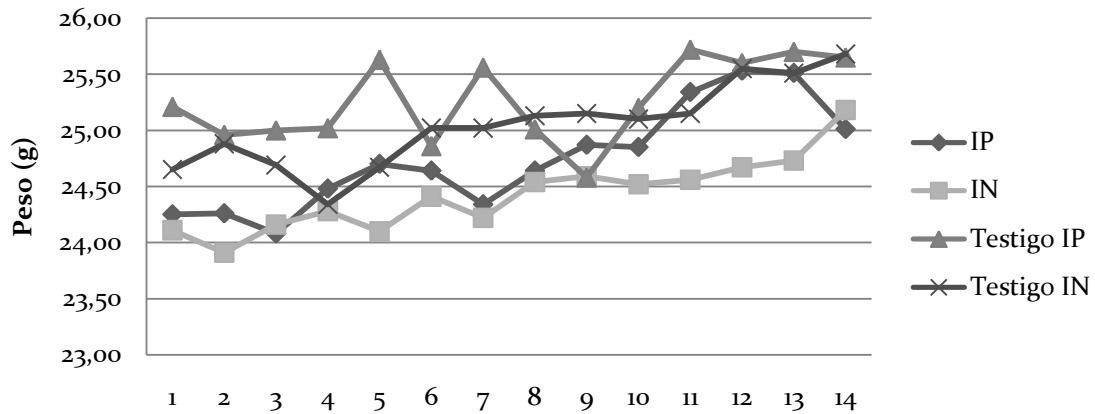
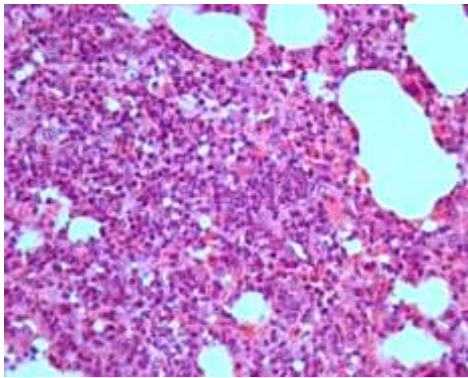
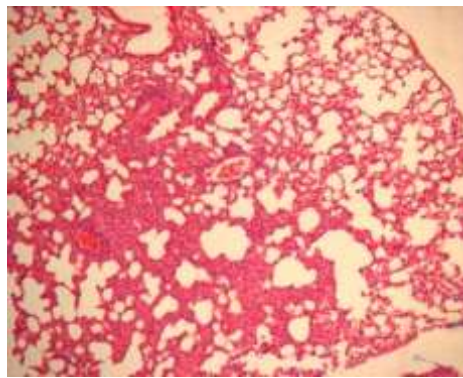


Figura 7. Variación en ganancia diaria de peso entre los ratones infectados por vía intraperitoneal (IP), intranasal (IN) y sus testigos desde el día 1 hasta el día 14 p. i., ($P < 0.01$). Puede apreciarse que el grupo IN tuvo una ganancia de peso menor durante casi todo el experimento.

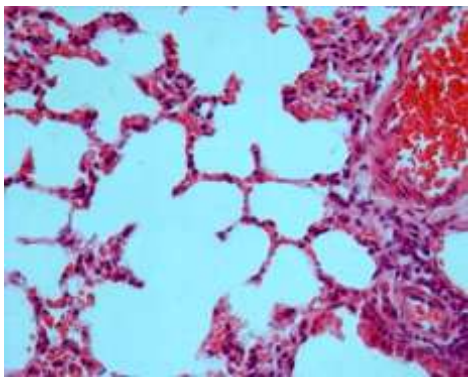
Por otro lado, en lo que respecta al análisis histopatológico se encontraron las mismas lesiones por ambas vías. A nivel pulmonar se observa neumonía intersticial discreta con agregados neutrofilicos (Figuras 8A-8C) además de necrosis hepática multifocal y la presencia de un cuerpo de inclusión intranuclear (8D-8G).



8A

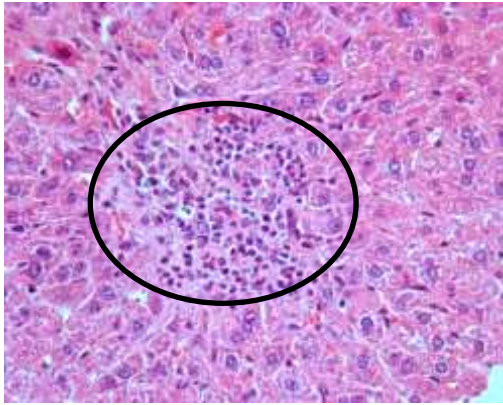


8B

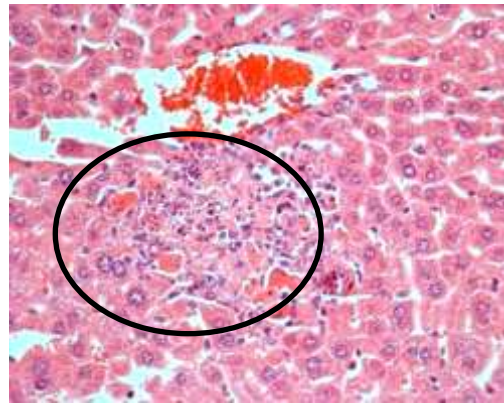


8C

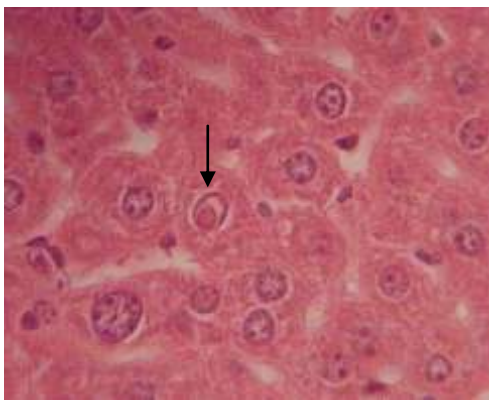
Figuras 8A-8C. Fotomicrografías que muestran engrosamiento intersticial en pulmones de ratones infectados con un aislamiento de campo de EHV-1. Las lesiones fueron observadas a los 15 días p. i. A) grupo i. n (40x); B) grupo i. p. (10x); C) testigo negativo (40x).



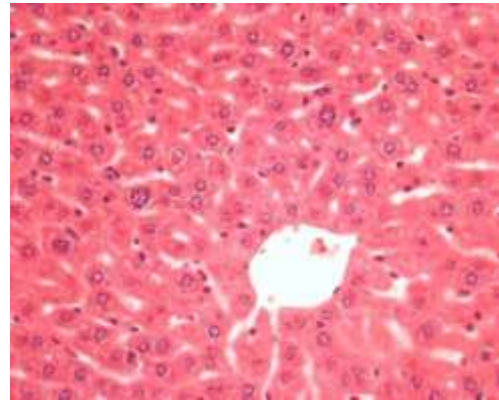
8D



8E



8F



8G

Figuras 8D-8G. Fotomicrografías en las que se muestra necrosis hepática focal (círculos) por EHV-1 en ratones infectados a los 15 días p. i. 8D: grupo i. n.; 8E: grupo i. p. (aumento de ambas: 10x); 8F: acercamiento que muestra cuerpo de inclusión intranuclear en un hígado del grupo i. p. (flecha); 8G: testigo negativo (aumento 10x).

Discusión

Al evaluar el efecto del DLE sobre la presentación de lesiones histopatológicas se pudo observar que los grupos se comportaron de forma distinta, siendo evidente la disminución de alteraciones en los animales que recibieron el tratamiento con DLE, aunque al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas, probablemente debido a que las variables se están considerando como cualitativas, es decir, presencia/ausencia de lesiones. Dentro de la revisión de literatura que se hizo para este trabajo únicamente se encontraron dos informes escritos de ensayos similares: en un modelo murino de infección con el virus de herpes simple se observó que el tiempo de recuperación, el grado de las lesiones en piel, así como la carga viral en bazo disminuyó en ratones tratados con DLE específico mientras que la producción de interferón- γ , citocina involucrada en la activación de la respuesta inmune contra el virus, se elevó⁸⁵. Por otro lado, en un modelo de infección con *M. tuberculosis* se encontró que el tratamiento con factor de transferencia indujo la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e iNOS al mismo tiempo que disminuyó la producción de IL-4. Este efecto resultó ser dosis-dependiente⁹⁶. La disminución en las lesiones histopatológicas en el modelo estandarizado para esta tesis podrían responder a un mecanismo similar ya que aunque en estos ensayos se trató con un virus y una bacteria, en ambos proyectos se trabajó con agentes intracelulares e incluso se llevaron a cabo con ratones de la misma cepa.

En este trabajo se logró establecer un modelo de infección murino que se caracterizó por la presencia de neumonía intersticial y focos necróticos en hígado. Estos resultados concuerdan parcialmente con trabajos previos^{63, 73} donde se reportan lesiones que consistían en una bronquiolitis discreta, neumonía catarral e infiltración muy leve de células inflamatorias en espacio peribronquial, además de neumonía intersticial con infiltrado de macrófagos. Con respecto a la necrosis hepática, esta no se ha reportado en ratón, sin embargo en trabajos realizados en la

década de 1950 en hámsters, los animales morían a consecuencia de necrosis hepática grave^{97, 98, 99, 100}. Debido a este antecedente, a que en los fetos equinos abortados se presenta necrosis hepática y al tipo de lesiones halladas en el modelo murino, se decidió intentar la infección por vía IP para probar si independientemente de la vía de inoculación se lograban reproducir ambas lesiones (hepáticas y pulmonares) y el resultado es un hallazgo muy importante. Como se ha podido leer en el marco teórico, la vía utilizada ha sido la intranasal debido a que asemeja la forma natural de entrada del virus; sin embargo, el manejo necesario para la infección requiere de un alto grado de destreza y tiempo, además de que en la mayoría de los casos existe una pérdida del inóculo, que no se puede calcular. En otros trabajos en los que se emplean hámsters se reportan resultados favorables con lesiones hepáticas e incluso existe un modelo en hámsters gestantes⁹⁷, sin embargo hasta donde se sabe la vía IP no se emplea en el ratón^{98, 99, 100}.

Por otra parte, en este modelo de infección se observó la diferencia en la ganancia de peso entre todos los grupos con la disminución de peso más pronunciada después del día 12 p. i., estos resultados contrastan con lo observado en los trabajos de Awan y col., ya que ellos notaron el retraso en la ganancia de peso dentro de los primeros 4-5 días p. i. y en los casos en que los ratones infectados se dejaron por más tiempo, notaron que poco a poco iban recuperándose⁶¹.

Además en todos los ensayos realizados existió una constante que fue la presencia prácticamente nula de signos clínicos en los animales infectados. Una posible explicación está basada en los resultados de Walker y colaboradores⁷⁰, quienes en 1998 infectaron ratones con dos cepas distintas de EHV-1: AB4, una cepa inglesa de alta patogenicidad, y Kentucky A, aislamiento norteamericano con efectos menos agresivo. Los efectos observados en el ensayo fueron marcadamente distintos.

El aislamiento de EHV-1 es un resultado muy importante ya que la información disponible acerca de este virus en nuestro país es muy escasa y hasta donde se sabe no hay grupos de investigación que trabajen con este agente.

El aislamiento obtenido para este trabajo, fue a partir de un aborto sin presentación clínica de la enfermedad en la madre, además de que se trató de un caso prácticamente aislado. Estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura², donde se reporta que, aunque es común la presentación de tormentas de abortos también es posible que se den casos como el expuesto en esta tesis. Además, el tropismo hacia hígado, que fue una constante en todos los experimentos del modelo murino establecido en este laboratorio podría estar relacionado con las características de la cepa viral aislada. En este sentido sería importante hacer la caracterización genética del aislamiento. Un ejemplo es el estudio de Nugent y colaboradores²⁸ en el que se amplificó la región correspondiente a la ADN polimerasa de varios aislamientos de EHV-1 y se notó que la presentación clínica de la enfermedad, neurológica o abortiva, coincidía con cambios de aminoácidos entre los aislamientos. Lograr la amplificación y caracterización de regiones virales relacionadas con la predisposición a una u otra presentación clínica representaría un dato importante para el conocimiento de las cepas circulantes en nuestro país.

Otra variable que podría ser determinante en los resultados de este estudio es el título viral con el que se infectó ($1 \times 10^{4.58}$); en otros trabajos desafían con títulos que varían entre 10^6 y 10^7 . En este trabajo no fue posible aumentar el título viral aún cuando se intentaron hacer pases en hámster como lo habían descrito trabajos de la década de 1970⁹⁷. La línea celular usada en este ensayo no ha sido ampliamente utilizada, por eso actualmente se está empleando la línea RK13. Con ésta se ha logrado una mejor adaptación viral a cultivo celular y se ha incrementado el título hasta $10^{6.5}$.

El aislamiento de campo, el modelo de infección y la tendencia protectora mostrada por el DLE permiten la continuación en las investigaciones con respecto a EHV-1 y representan información importante ya que los datos disponibles acerca de este virus en nuestro país son escasos.

Conclusiones

Se logró establecer el modelo murino de infección con un aislamiento de campo en el que se encontraron diferencias en la ganancia de peso y presencia de focos de necrosis hepática hallazgo que no había sido reportado más que en abortos equinos.

La administración intraperitoneal de dos microgramos de DLE por 5 días, mostró una tendencia a la disminución en la presencia de lesiones histopatológicas en ratones infectados intranasalmente con EHV-1, aunque el resultado no fue estadísticamente significativo.

Prospectivas

Hacer caracterizaciones moleculares del virus para indagar la posible relación entre la cepa viral y la presentación de signos y lesiones en el modelo murino.

Realizar estudios en los que se evalúe la respuesta inmune en los animales infectados y tratados con DLE, para comprender mejor el efecto del DLE.

Estandarizar el modelo de infección en ratonas gestantes para evaluar la acción profiláctica en esta etapa fisiológica.

Hacer una búsqueda exhaustiva de nuevos aislamientos, secuenciarlos, tipificarlos y compararlos con los que se encuentran registrados en las bases de datos internacionales para poder iniciar un estudio epidemiológico.

Este modelo de infección puede ser de mucha utilidad para las pruebas encaminadas al desarrollo de vacunas.

Referencias

- ¹ Dimock WW and Edwards PR. 1933. Is there a filterable virus of abortion in mares? *Ky. Agr. Exp. Sta. Bull.* 333 (Suppl.). 297-301.
- ² Bryans JT and Allen GP. Herpesviral diseases of the horse. In: Wittmann G, editor. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Massachusetts. Kluwer Academic Publishers. 1989: 176-229.
- ³ Edington N, Bridges CG, Patel JR. 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis induced by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Archives of Virology.* 90: 111-124.
- ⁴ Slater JD, Borchers K, Thackery AM, Field H. 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 (EHV-1) latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology.* 75: 2007-2016.
- ⁵ Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GJ, Mumford, JA. 1994. Distribution of equid herpesvirus-1 in the respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Veterinary Journal.* 26: 470-473.
- ⁶ Kydd JH, Watrang E, Hannant D. 2003. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 96: 207-217.
- ⁷ OIE.int [Homepage on the Internet]. Paris: World Organisation for Animal Health; c 2007 [updated 2004 jul 23; cited 2007 jan 11]. Available from: <http://www.oie.int>
- ⁸ Boehmer PE and Nimonkar AV. 2003. Herpesvirus replication, Review article. *IUBMB Life.* 55: 13-22.
- ⁹ Perkins G, Ainsworth DM, Erb HN, Del Piero F, Miller M, Wilkins PA, Palmer J and Frazer M. 1999. Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal Equine herpesvirus-1 infection compared with septic and premature foals. *Equine Vet J.* 31; 5: 422-426.
- ¹⁰ Whitley RJ, Kimberlin DW and Roizman B. 1998. State-of-the-art Clinical Article. Herpes Simplex viruses. *Clinical Infectious Diseases.* 26:541-555.
- ¹¹ Dohner K, Wolfstein A, Prank, U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, and Sodeik B. 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell.* 13: 2795-2809.
- ¹² Ojala P M, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U and Helenius A. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4922-4931.
- ¹³ Garber DA, Beverley SM and Coen DM. 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology.* 197: 459-462.
- ¹⁴ Smith KC. 1997. Herpes viral abortion in domestic animals. *Vet. J.* 153; 253-268
- ¹⁵ Patel JR, Heldens J. 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *The Veterinary Journal.* 170: 14-23.

- ¹⁶ Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N. 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: Detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.* 73: 261-268.
- ¹⁷ Minke JM, Audonnet JC, Fischer L. 2004. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res.* 35; 4: 425-43.
- ¹⁸ Thompson GR, Mumford JA and Smith IM. 1979. Experimental immunization against respiratory disease due to equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Veterinary Journal.* 8:58-65
- ¹⁹ Allen GP, Kydd JH, Slater JD and Smith KC. 1999. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In : Wernery U, Wade JF, Mumford JA, Kaaden OR (Eds.). *Equine infectious diseases VIII.* R&W Publications, Newmarket, UK, pp. 129-146.
- ²⁰ Patel JR, Bateman H, Williams J and Didlick S. 2003. Derivation and characterization of a live equid herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1. *Veterinary Microbiology.* 91:23-39
- ²¹ Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D and Mumford JA. 1992. Abortion of virologically negative fetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus-1. *Equine Veterinary Journal.* 24: 246-259.
- ²² Smith KC. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. *The Veterinary Journal.* 153: 253- 268.
- ²³ Doll ER. 1952. Seasonal incidence and fetal age in equine viral abortion. *Cornell Veterinarian.* 42: 305- 509
- ²⁴ Allen GP and Bryans JT. 1986. Molecular epizootiology pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology.* 2: 78-144.
- ²⁵ Matsumara T, Sugiura T, Imagawa H, Fukunaga Y and Kamada M. 1992. Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus among horse populations. *J. Vet. Med. Sci.* 54:207-211
- ²⁶ Jackson TA, Osburn BI, Cordy DR and Kendrick JW. Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. 1977. *Am. J. Vet. Res.* 38: 709-719.
- ²⁷ Kohn CW and Fenner WR. Equine herpes myeloencephalopathy. 1987. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 3: 405-419.
- ²⁸ Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP and Davis-Poynter N. 2006. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology.* 80; 8: 4047-4060.

- ²⁹ Allen GP and Breathnach CC. 2006. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* 38: 252-257
- ³⁰ Yamada S, Matsumara T, Tsujimura K, Yamaguchi T Ohya K and Fukushi H. 2008. Comparison of the Growth Kinetics of Neuropathogenic and Non-neuropathogenic Equid Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Strains in Cultured Murine Neuronal Cells and the Relevance of the D/N752 Coding Change in DNA Polymerase Gene (ORF30). *J. Vet. Med. Sci.* 70; 50: 505-511
- ³¹ Doll ER, Crowe MEW, McCollum WH and Bryans JT. 1959. In vitro serum neutralization of hamster propagated equine rhinopneumonitis virus. *Cornell Vet.* 49: 28-33.
- ³² Pette J. 1966. Development of a living virus vaccine against rhinopneumonitis of horses. In: Bryans JT (Ed.). *Proceedings of the first international conference on equine infectious diseases*. The Garyson Foundation, Lexington, Kentucky, USA. pp. 112-116.
- ³³ Mitchell D, Papp Vid G, Girard A, Bryans JT and Gerber H. 1978. A challenge study on pregnant pony mares following vaccination with a modified live equine herpesvirus 1 (EHV-1) vaccine. In: Bryans JT, Gerber H (Eds.). *Equine infectious diseases IV*. Veterinary Publications, Princeton, New Jersey, USA. pp. 69-73
- ³⁴ Bryans JT. 1978. Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. In: Bryans JT, Gerber H (Eds.). *Equine infectious diseases IV: Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Lyon, France, 1976. Veterinary Publications, Princeton, New Jersey. *J. Equine Med. Surg.* (Suppl. 1):83-92.
- ³⁵ Bryans JT and Allen GP. 1982. Application of a chemically inactivated vaccine to control abortigenic infection of mares by equine herpesvirus. *Dev. Biol. Stand.* 52: 490-493.
- ³⁶ Burrows R, Goodridge D and Denyer MS. 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. *Vet. Rec.* 114: 369-374.
- ³⁷ Burki F, Rossmanith W, Nowotny N, Pallan C Mostl K and Lussy H. 1990. Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet. Q.* 12: 80-86.
- ³⁸ Hannant D, Jesset D, O'Neill T, Dolby CA, Cook RF and Mumford JA. 1993. Responses of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus to the homologous strain. *Res. Vet. Sci.* 54:299-305.
- ³⁹ Heldens JG, Hannant D, Cullinane AA, Pendergast MJ, Mumford JA, Nelly M, Kydd JH, *et al.* 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV-1 and EHV-4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV 1, 4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine.* 19: 4307-4317

- ⁴⁰ Kydd JH, Townsend HGG and Hannant D. 2006. The equine immune response to equine herpesvirus-1: The virus and its vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 111; 15-30.
- ⁴¹ Mumford JA, Rosedale PD, Jesset DM, Gann SJ, Ousey J and Cook RF. 1987. Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 509-518.
- ⁴² Doll ER. 1961. Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 139: 1324-1330.
- ⁴³ O'Neill T, Kydd JH, Allen GP, Wattrang E, Mumford JA and Hannant D. 1999. Determination of equid herpesvirus 1-specific CD8+, cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies in ponies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70: 43-54.
- ⁴⁴ Kydd JH, Smith KC, Hannant D, Livesay GL, Mumford JA. 1994. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet. J.* 26: 466-469.
- ⁴⁵ Scott JC, Dutta SK and Myrup AC. 1983. In vivo harbouring of equine herpesvirus-1 in leucocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1344-1348.
- ⁴⁶ Slater JD, Baxi M, Tewari D, Gibson JS, Dield HJ, Ludwig H, Steinbach F and Borchers K. 1994. In: Plowright W, Nakajima H (Eds.). Experimental infection of specific pathogen ponies with Equid herpesvirus-1: Detection of infectious Virus and Viral DNA. Equine infectious diseases VII. R&W Publications, Newmarket, UK, pp. 255-260.
- ⁴⁷ Allen GP, Coogle LD, Ostlund EN and Yeargan MR. 1992. Molecular dissection of two major equine herpesvirus-1 glycoprotein antigens. (gB and gC) that elicit humoral immune response in the horse. In: Plowright W, Rosedale PD, Wade JF (Eds.). Equine infectious diseases VI. R&W Publications, Newmarket, UK, pp. 181-193.
- ⁴⁸ Thomson GR, Mumford JA, Campbell J, Griffiths L and Clapham P. 1976. Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.* 8: 58-65.
- ⁴⁹ Breathnach C, Yeargan MR, Sheoran AS, Allen GP. 2001. The mucosal humoral immune response of the infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Vet. J.* 33: 651-657.
- ⁵⁰ Edington N, Bridges CG and Griffiths L. 1989. Equine interferons following exposure to equid herpesvirus-1 or 4. *J. Interferon Res.* 9: 389-392.
- ⁵¹ Breathnach CC, Soboll G, Suresh M and Lunn DP. 2005. Equine herpesvirus-1 infection induces IFN-gamma production by equine T lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103: 207-215.
- ⁵² Charan S, Palmer K, Chester P, Mire-Sluis AR, Meager A and Edington N. 1997. Transforming growth factor-beta induced by live or ultraviolet-inactivated equid herpesvirus type-1 mediates immunosuppression in the horse. *Immunology.* 90: 586-591.

- ⁵³ Hannant D, O'Neill T, Jessett DM and Mumford JA. 1991. Evidence for non-specific immunosuppression during the development of immune responses to equid herpesvirus-1. *Equine Vet. J. (Suppl.)*. 41-45-
- ⁵⁴ Hannant D, O'Neill T, Ostlund EN, Kydd JH, Hopkin P and Mumford JA. 1999. Equid herpesvirus-induced immunosuppression is associated with lymphoid cells and not soluble circulating factors. *Viral Immunol.* 12: 313-321.
- ⁵⁵ Siedek EM, Whelan M, Edington N and Hamblin A. 1999. Equine herpesvirus type 1 infects dendritic cells in vitro: Stimulation of T lymphocyte proliferation and cytotoxicity by infected dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67: 17-32
- ⁵⁶ Rappocciolo G, Birch J and Ellis SA. 2003. Down-regulation on MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 84: 293-300.
- ⁵⁷ Ambagala ARN, Gopinath RS and Srikumaran S. 2004. Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 85: 349-353.
- ⁵⁸ Kydd JH, Hannant D and Mumford JA. 1996. Residence and recruitment of leucocytes to the equine lung after EHV-1 infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52: 15-26.
- ⁵⁹ Smith PM, Zhang Y, Rennings SR and O'Callaghan DJ. 1998. Characterization of the Cytolytic T-Lymphocyte Response to a Candidate Vaccine Strain of Equine Herpesvirus 1 in CBA Mice. *Journal of Virology.* 72; 7: 5366-5372.
- ⁶⁰ Smith PM, Kahan SM, Rorex CB, Einem J, Osterrieder N and O'Callaghan DJ. 2005. Expression of the Full-Length Form of gp2 of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Completely Restores Respiratory Virulence to the Attenuated EHV-1 Strain KyA in CBA Mice. *Journal of Virology.* 79; 8: 5105-5115.
- ⁶¹ Awan R, Chong Y, Field HJ. 1990. The pathogenesis of equine Herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *Journal of General Virology.* 71: 1131-1140.
- ⁶² Bartels T, Steinbach F, Hahn G, Ludwig H and Borchers K. 1998. *In situ* study on the pathogenesis and immune reaction of equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. *Immunology.* 93: 329-334.
- ⁶³ Van Woensel, Goovaerts D, Markx and Visser N. 1995. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. *Journal of Virological Methods.* 54: 39-49.
- ⁶⁴ Inazu M, Tsuha O, Kirisawa Y, Kawakami Y, Iwai H. 1993. Equid herpesvirus 1 infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 119-121
- ⁶⁵ Csellner H, Whalley JM, Love DN. 1995. Equine herpesvirus 1 HVS25A isolated from an aborted foetus produces disease in BALB/c mice. *Aust. Vet. J.* 72: 68-69.
- ⁶⁶ Baxi MK, Borchers K, Bartels T, Schellenbach A, Baxi S, Field HJ. 1996. Molecular studies of the

acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model. *Virus Res.* 40: 33-45.

⁶⁷ Marshall KR, Field HJ. 1997. Demonstration of equine herpesvirus-1 neuronal latency in murine olfactory

bulbs using a novel combined in situ PCR and protein synthesis method. *Virology.* 229: 279-282.

⁶⁸ Awan AR, Gibson JS, Field HJ. 1991. A murine model for studying EHV-1-induced abortion. *Res. Vet. Sci.* 51: 94-99.

⁶⁹ Kukreja A, Walker C, Fitzmaurice T, Awan A, Love DN, Whalley JM, Field HJ. 1998. Protective effects of equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein B in a murine model of EHV-1-induced abortion. *Vet. Microbiol.* 62: 303-311.

⁷⁰ Walker C, Perotti VM, Love DN, Whalley IM, 1998. Infection with equine herpesvirus 1 (EHV-1) strain HVS25A in pregnant mice, *J. Comp. Path.* 120: 15-27

⁷¹ Colle CF, Tarbet EB, Grafton WD, Jennings SR, O'Callaghan DJ. 1996. Equine herpesvirus-1 strain KyA, a candidate vaccine strain, reduces viral titers in mice challenged with a pathogenic strain. *RaCL. Virus Res.* 43: 111-124.

⁷² Azmi M, Field HJ. 1993. Cell-mediated antiviral response to equine herpesvirus type 1 demonstrated in a murine infection model by means of adoptive transfer of immune cells. *J. Gen. Virol.* 74: 275-280

⁷³ Walker C, Love DN and Millar Whalley J. 1999. Comparison of the pathogenesis of acute herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Veterinary Microbiology.* 68:3-13

⁷⁴ Kirkpatrick C. 1993. Structural nature and functions of transfer factor. *Ann NY Acad Sci.* 685: 362-7

⁷⁵ Lawrence HS. 1955. The transfer in humans of delayed skin sensitivity to Streptococcal M substances and to tuberculin with disrupted leukocytes. *J Clin Invest.* 34: 219-30.

⁷⁶ Rozzo SJ, Kirkpatrick C. 1992. Purification of transfer factor. *Mol Immunol.* 29:167-82.

⁷⁷ Kirkpatrick CH. 2000. Transfer Factor: Identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol Med.* 6: 332-341.

⁷⁸ Fudenberg HH. 1989. Transfer factor: Past, present and future. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 29

⁷⁹ Levin AS. 1970. Wiskott-Aldrich syndrome, a genetically determined cellular immunology deficiency: clinical and laboratory responses to therapy with transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67: 821-828.

⁸⁰ Kirkpatrick CH, Rozzo SJ and Mascali JJ. 1985. Murine transfer factor III. Specific interactions between transfer factor antigen. *J Immunol.* 135: 4027-4033

⁸¹ Berrón-Pérez R, Chávez-Sánchez R, Estrada-García I, Espinosa-Padilla S, Cortez-Gómez R, Serrano-Miranda E, *et al.* 2007. Indications, usage and dosage of the transfer factor. *Revista Alergia México.* 54; 4: 134-39.

- ⁸² Estrada-Parra S, Velasco-Castrejón O, Rébora F, Díaz ML, Padierna J. 1983. Immunotherapy of advanced pulmonary tuberculosis with specific transference factor. *Salud Pública Mex.* 25: 589-599.
- ⁸³ Padierna L, Godínez S, Díaz J, García E, Argaez MA, Velasco O, Padierna J, Estrada-Parra S. 1985. Factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología.* 11:293-299.
- ⁸⁴ Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Gritti F, Raise E, Fudenberg HH, De Vinci C, Viza D. 1996. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy.* 9: 41-47.
- ⁸⁵ García Barrera AA. 2008. Estudio de la respuesta inmune celular vía interferón γ en un modelo murino ante una infección con HSV-1 y con un tratamiento con extractos dializables de leucocitos. Tesis grado Químico Biólogo Parasitólogo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.
- ⁸⁶ Calzada NG. 2000. 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.* Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.
- ⁸⁷ Klesius PH, Giambone JJ. 1984. Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. *Poult Sci.* 63: 1333-1337.
- ⁸⁸ Bravo A. 2007. IL 2 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 grado Médico Veterinario Zootecnista.* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- ⁸⁹ Bridges CG, Edington N. 1986. Innate immunity during Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) infection. *Clin. Exp. Immunol.* 65: 172-181.
- ⁹⁰ Fudenberg HH & Pizza G. 1993. Transfer factor: New frontiers. *Progress in Drug Research.* 42: 309-40
- ⁹¹ Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS y Rodríguez-Padilla C. 2004. Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *International Immunopharmacology.* 4: 1577-1586.
- ⁹² Martínez JP, Martín Ocampos GP, Fernandez LC, Fuentealba NA, Cid de la Paz V, Barrandeguy M & Galosi CM. 2006. Detection of equine herpesvirus genome 1B in Argentina. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 25; 3: 1075-1079
- ⁹³ Donaldson MT. Equine Herpesvirus. In: Robinson, NE. *Current therapy in equine medicine.* 5^o ed. Saunders, 2003: 38-43.
- ⁹⁴ Cook RF, O'Neill T, Strachan E, Sundquist B and Mumford JA. 1990. Protection against lethal equine herpes virus type 1 (subtype) infection in hamsters by immune stimulating complexes (ISCOMs) containing the major viral glycoproteins. *Vaccine.* 8: 491- 496.

⁹⁵ NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*. 6 de diciembre de 1999.

⁹⁶ Fabre RA, Pérez TM, Aguilar LD, Rangel MJ, Estrada-García I, Hernández-Pando R and Estrada-Parra S. 2004. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 215-223.

⁹⁷ Burek JD, Roos RP and Narayan O. 1975. Virus-induced abortion. Studies of equine herpesvirus 1 (abortion virus) in hamsters. *Lab. Invest.* 33:400-406.

⁹⁸ Randall CC and Bracken EC. 1957. Studies on hepatitis in hamsters infected with equine abortion virus I. Sequential development of inclusions and the growth cycle. *Am. J. Pathol.* 33:709-727.

⁹⁹ Randall CC and Bracken EC. 1957. Studies on hepatitis in hamsters infected with equine abortion virus II. Changes in protein, nucleic acid, and weight of isolated hepatic nuclei. *Am. J. Pathol.* 33: 1009-2.

¹⁰⁰ Gentry GA and Randall CC. 1960. Studies on hepatitis in hamsters infected with equine abortion virus III. Nuclear protein changes. A histochemical study. *Am. J. Pathol.* 37: 433-441