

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“Expresión de las proteínas M2e del virus de influenza tipo A, CJUARK de  
*Campylobacter jejuni* y CD 154 (CD40L) en *Nicotiana benthamiana* y su evaluación  
inmunológica en pollo de engorda comercial”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**INKAR ALEJANDRO CASTELLANOS HUERTA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. MIGUEL ÁNGEL GÓMEZ LIM**

**DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MEX**

**2010**



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.

## DEDICATORIA

Les dedico este logro a mi padre Godofredo Moisés Castellanos Reyes y a mi madre Maria de Lourdes Huerta Luna, los cuales siempre han confiado en mí y me apoyaron desde pequeño a lograr mis metas y nunca rendirme pase lo que pase. A mi hermano Ekne Moisés Castellanos Huerta y a su familia, sepan que los quiero mucho y que han sido parte de mí desde siempre.

Les dedico también este logro a mi tía Gloria Huerta la cual ha sido como una abuela para mí, muchas gracias por siempre estar conmigo, a sus hijos y familias, Leticia Bautista, Maura Bautista, Francisco Bautista y Arturo Bautista, así como a mi tío Fidel Bautista que en paz descanse.

A Mis queridos suegros la Sra. Dora Emma Ramírez Ponce y al Sr. Raul Armando Godina y familia, que me ayudaron y apoyaron a mi y a mi amada esposa.

Dedico este logro a mi amada esposa, Maria Isabel Godina Ramirez, sin ti amor, no hubiera logrado nada, siempre me has apoyado pase lo que pase y yo haré lo mismo por ti hasta que muera, Te amo. A mi hija Sankari Isabel Castellanos Godina, que ha sido una bendición para mí, quiero que sepas que te amo hija mía, que eres junto con tu madre, lo más importante que tengo y que siempre estaré para ti, todos los logros que tengo y tendré siempre serán dedicados a ustedes.

Por ultimo y no por eso menos importante, le dedico este logro a DIOS.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera mencionar a toda la gente que me apoyo, sin embargo si olvidase a alguien le pido una profunda disculpa.

Quisiera agradecer a mi honorable jurado conformado por la Dra. Susana Mendoza Elvira, Dr. Álvaro Aguilar Setién, Dr Gary García Espinosa, Dr Ernesto Moreno Martínez y el Dr Guillermo Téllez Isaías, agradezco el tiempo que dedicaron para la revisión del presente texto, así como también por la corrección al mismo. Gracias

Agradezco al Dr Ernesto Moreno Martínez todo el apoyo incondicional y confianza que me proporción sin su apoyo no hubiese sido posible realizar el presente proyecto.

Agradezco al Dr Miguel Ángel Gómez Lim por la propuesta de tema de tesis, así como su participación en el desarrollo de investigación, permitiéndome acceder a su laboratorio y participar con su equipo técnico y alumnado. Le agradezco todo su apoyo Dr.

A las personas que me ayudaron al tener la paciencia para enseñarme y guiarme en el laboratorio del CINVESTAV Campus Irapuato, muchas gracias Jorge por tu paciencia y toda tu ayuda, aprendí mucho de ti, a todos los muchachos del laboratorio, Carlos, Nancy, Laura, Denis, Margarita, muchas gracias a todos.

Al Dr Victor Manuel Petrone García, gracias por ayudarme a encontrar este camino, muchas gracias “Doc”.

Al Dr Juan Carlos Del Río García, muchas gracias por guiarme en el proyecto y por ayudarme cuando más lo necesite, muchas gracias Dr.

Al Dr Guillermo Téllez Isaías, Dr Billy M Hargis y el Dr Walter Bottje, por confiar en mí y ayudarme desde el principio a desarrollar este proyecto, por ayudarme a realizar la estancia en la Universidad de Arkansas en Poultry Health Laboratoty, Center of Excellence in Poultry Sciencie, mil gracias Doctores por todo su apoyo. (Thank for all the help and support, thank you).

Agradezco a la Dra Sherry Layton, por toda su ayuda dentro del laboratorio y fuera del, muchas gracias. Thank you for all, Sherry.

Al Dr Isidro Fernández, Lic Diego Fernández, por su apoyo a mi formación y desarrollo laboral.

A mis amigos de la maestría, Jesús Zavaleta y Rubén Torres, muchas gracias muchachos.

## Índice

	Página
Dedicatoria y agradecimientos	I
Resumen	2
Abreviaciones	6
Introducción	9
• <i>Campylobacter jejuni</i>	9
• Influenza Aviar	12
• Partículas parecidas a virus	20
• Expresión proteica en plantas	22
• Núcleo de hepatitis B (HBcAg) como vector.	25
• Respuesta inmune en mucosas	27
• CD40L (CD154)	28
Justificación	33
Hipótesis	33
Objetivos	33
Materiales y métodos	34
Resultados	39
Discusión	41
Conclusiones	45
Anexo	46
Bibliografía	51

## Resumen

El género *Campylobacter spp*, especialmente *Campylobacter jejuni*, es causante de infecciones intestinales en pollo, pavos y aves acuáticas. En humanos esta infección está relacionada al consumo de productos avícolas contaminados, leche contaminada y carne de bovino. Actualmente la relevancia en el caso de infecciones con *C. jejuni* en humanos, ha aumentado debido a los problemas de resistencia a antibióticos y los efectos de estas infecciones los cuales se ha relacionado a procesos autoinmunes como el síndrome de Guillian-Barré y artropatías. *Campylobacter spp* se transmite vía oral-fecal, colonizando criptas de mucosa de ciego así como intestino delgado de pollo. La transmisión horizontal es considerada como la principal vía de contaminación por parte de aves silvestres, animales de granja así como otros vectores. El desarrollo de estrategias efectivas en contra infecciones y contaminación con *C. jejuni* a lo largo de la cadena de producción en la industria avícola, es uno de los más importantes pasos a seguir para la prevención de pérdidas económicas y daño a seres humanos, por lo que el empleo de vacunas contra *C. jejuni* efectivas presentan una alta relevancia. La influenza Aviar (IA), es reconocida como una enfermedad que va desde signología respiratoria a enfermedades sistémicas con una mortalidad cercana al 100%. El virus de IA (vIA) es clasificado en la familia *Orthomyxoviridae* género *Influenzavirus A*. IA es considerada como un problema global por lo que su prevención y control requieren de una cooperación internacional. En la superficie del vIA se presentan dos glicoproteínas, hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). El virus de Influenza (vI) se organiza en géneros resultando en tres tipos A, B y C, donde el vIA pertenece al tipo A. Existen 16 HA y 9 NA, donde la mayoría de estas combinaciones se han aislado en pollos y en aves silvestres. La vacunación y bioseguridad son las principales estrategias de control para IA. Actualmente las vacunas contra IA no pueden proteger contra todos los serotipos conocidos, debido a variaciones antigénicas entre las diferentes HA y NA. Actualmente se propone el empleo del ectodominio de la proteína M2 del vI (M2e) para la vacunación contra vI; esta es una proteína integral de membrana (homodimero), con función de canal selectivo de protones; esta proteína es altamente conservada en todos los vI tipo A. Estudios realizados indican que mediante el empleo del M2e, es posible la reducción de signos clínicos y mortalidad en infecciones con vI de alta patogenicidad (HP). Para lograr una correcta presentación de un antígeno ante el sistema inmune, se propone el empleo de proteínas virales parecidas a virus (VLP's). Mediante el empleo de estos es posible favorecer el reconocimiento de epítopos presentes en la superficie de

estos VLP's. Estos VLP's o virus quimeras han sido investigados con diversos epítomos y su expresión ha sido lograda en modelos eucariotas como procariotas. Las plantas son uno de los modelos eucariotas; la producción de proteínas exógenas dentro del tejido vegetal se logra mediante diversos métodos. En este experimento, se propuso el uso de el VLP's HBcAg como plataforma para la expresión de epítomos de *C. jejuni* (CJUARK), M2e de IA y CD154 (CD40L) de aves. La expresión de estas proteínas fue llevada a cabo en *Nicotiana benthamiana* transformada mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Los resultados muestran que la expresión de estas proteínas se logra (VLP HBcAg+M2e+CJUARK y HBcAg+M2e+CD154) en el tejido de las hojas de *N. benthamiana*. La producción de IgY en contra de M2e muestra una diferencia significativa entre el grupo no vacunado y los grupos vacunados al día 21 post-administración tanto vía oral como subcutánea. En su evaluación posterior a los 31 días, es posible observar un significativo aumento solo en el grupo que recibió una administración subcutánea, demostrando que esta vía resulta ser la mejor ruta para la estimulación de IgY humorales a diferencia de los grupos que recibieron una administración oral. A la evaluación en la colonización de *C. jejuni* es posible observar una reducción apreciable en los grupos que recibieron el antígeno CJUARK en combinación con el antígeno M2e, sin embargo los resultados muestran que la vía oral resulta ser la más efectiva vía de administración para la reducción en la colonización de *C. jejuni* debido a que los resultados muestran una diferencia significativa en comparación con el resto de los grupos incluyendo aquellos que recibieron el epítomo CJUARK por vía subcutánea.

## **Abstract**

The genus *Campylobacter* spp, especially *Campylobacter jejuni*, produces intestinal infection in chickens and also in turkeys and waterfowls. Human infection is frequently related with ingestion of contaminated poultry products, unpasteurized milk and red meat. Nowadays the importance of infections with *C. jejuni* has increased, because the appearance of drugs-resistant strains in human patients; with the possible results of these infections like autoimmune conditions either Guillain-Barré syndrome or arthropathies. *Campylobacter* spp spreads by fecal-oral route and colonize the crypts mucosa of the caeca and small intestine. Horizontal transmission is the most probable mechanism with possible source like wild birds, farm animals, and other possible vectors. The development of effective strategies against infection and contaminations with *C. jejuni* through the chain of production in poultry productions is one of the most important steps to follow to prevent economical loss and effects in human. Avian Influenza (IA) is recognized as a systemic disease that produces syndromes ranging asymptomatic to systemic disease with near 100% mortality. IA viruses (vIA) are classified in the family *Orthomyxoviridae* genus *Influenzavirus* A. IA is considered a global issue and the preventions and control requires international cooperation. The surface of IA virus presents two types glycoprotein projections, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Influenza virus (vI) are organized in groups, these classification results in three types, A, B and C, where AI belongs to type A. A subclassification of IA describes 16 HA and 9 NA, majority of combinations of HA and NA have been seen in IA virus isolated in poultry and wild birds. Vaccinations and biosecurity are the principal strategies for control of IA, nowadays these vaccines can not give protection to a lot of serotypes, and this is because chickens are susceptible to any serotypes of the 16 HA known. Antigenic variations in HA and NA among serotypes are common. Nowadays, investigations of vI result in development of a vaccine based on a small ectodomain of protein M2, denominated M2e, this M2e protein is highly conserved across vI subtypes A. Test results indicate that by using M2e, is possible to reduce mortality and clinical signology in infections of vI highly virulent (HP). To achieve a correct presentation of any antigen to immune system, virus like proteins (VLP's) are proposed. By using VLP's, it is possible to promote the immune recognizing of the epitopes on the surface of this VLP's. These VLP's or chimera viruses have been tested with different epitopes and its expression has been achieved in eukaryotic and prokaryotic models. Plants are one of these models; the production of foreigner proteins into the plant's tissue has been

achieved by using different methods. In this experiment, we proposed to use of VLP's HBcAg as a platform for the expression of epitopes from *C. jejuni* (CJUARK), M2e of IA and CD154 (CD40L) from birds. The expression was performed in *Nicotiana benthamiana* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that the expression of these proteins can be achieved (VLP HBcAg+M2e+CJUARK and HBcAg+M2e+CD154) into leaf of *N. benthamiana*. The production of IgY against M2e showed significant differences between group no vaccinated and groups vaccinated on 21 day pos-administration either oral or subcutaneous route. In the evaluation after 31 days pos-administration, it is possible to observe a significant alone increase in the groups which received a subcutaneous administration, demonstrating that subcutaneous application turns out to be the best route of application to obtain an immune response humoral (IgY) unlike the groups that received an oral administration. In the evaluation of the settling of *C. jejuni* is possible to observe a valuable reduction in the groups that received antigen CJUARK in combination with antigen M2e, nevertheless the results showed the oral route turns out to be the most effective for the reduction in the settling of *C. jejuni*, since the result demonstrates a significant difference in comparison with the rest of the groups including the group that received the antigen CJUARK subcutaneous route.

## Abreviaciones

A	Alanina
aa's	Aminoácidos
AND	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APC	Celulas presentadoras de antígenos
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
BC	Bolsa cloacal
CG	Centros germinativos
CPA	Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas en los Animales
DC	Células dendríticas
E	Glutamato
ELD50	Dosis letal embrión al 50 %
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAE	Epitelio asociado a folículos
FDC	Células dendríticas foliculares
g	Gramos
GALT	Tejido linfoide asociado a tracto digestivo
GBS	Síndrome de Guillain-barré
GH	Glándula de Harder
HA	Hemaglutinina
HBcAg	Núcleo antigénico del virus de hepatitis B
HBeAg	Antígeno "e" del virus de hepatitis B
HI	Inhibición de la hemaglutinación
HP	Alta patogenicidad
I	Isoleucina
IA	Influenza aviar
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgY	Inmunoglobulina Y
IL	Interleucina
ISCOM	Complejos inmunoestimuladores
L	Leucina
LB	Linfocito B
LP	Baja patogenicidad
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Linfocito T
vLT	Laringotraqueitis
LTh	Linfocito T ayudante
M	Metionina
M1	Proteína Matriz 1
M2	Proteína Matriz 2
M2e	Ectodominio de la proteína M2 del vI
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
mARN	ARN mensajero

MD	Divertículo de Meckel
mg	Miligramos
MHC	Complejo de histocompatibilidad
ml	Mililitros
N	Asparagina
NA	Neuroaminidasa
NALT	Tejido linfoide asociado a cavidad nasal
NeuAC	Ácido N-acetil neuroaminico
NeuGC	Ácido N-glicolil neuroaminico
NI	Inhibición de la neuroaminidasa
NK	Células natural killer
NOM	Norma oficial Mexicana
OD	Densidad óptica
OIE	Organización mundial de la salud animal
OLP	Órganos linfoides primarios
OLS	Órganos linfoides secundarios
ORF	Marco de lectura abierto
P	Prolina
PAG	Precipitación en gel de agar
PAL	Lipoproteínas asociadas al peptidoglicano
PAMP	Patrones moleculares asociados a microbios
	Patógenos
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PCR tiempo real	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
PP	Placas de Peyer
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
R	Arginina
RNP	Complejo ribonucleo proteína
rpm	Revoluciones por minuto
S	Serina
SA	Ácido siálico
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación
	Tejido linfoide asociado a piel
SALT	SA $\alpha$ 2, 3 galactosa
SA $\alpha$ 2, 3Gal	Inmunoglobulina secretora
sIgA	Treonina
T	ADN de transferencia
T-ADN	Tonsilas cecales
TC	Tonsilas esofágicas
TE	Factor de necrosis tumoral
TNF	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$	Plásmido Tumor-inductor
Ti-ADN	Tonsilas pilóricas
TP	Unidades formadoras de colonia
UFC	Valina
V	ARN de cadena sencilla de sentido negativo
vARN (-) ss	Virus de influenza aviar
vIA	

VLP's

W

Y

µg

Particulas parecidas a virus

Triptófano

Tirosina

Microgramos

## INTRODUCCIÓN

### *Campylobacter jejuni*.

*Campylobacter spp* es una bacteria Gram negativa, sensible a la desecación, pH bajos y al almacenaje prolongado, <sup>1,2</sup> con una longitud de 0.5 a 8  $\mu$  y 0.2 a 0.5  $\mu$  de ancho con forma en espiral o en forma de “S”, <sup>3,4</sup> la cual generalmente, presenta un flagelo en uno ó en ambos extremos, con capacidad de movilización rápida. <sup>5</sup> La clasificación de especies de *Campylobacter spp* (cuerda torcida) <sup>3</sup> basada en sus reacciones bioquímicas resulta difícil. <sup>6</sup> Las diferentes especies de *Campylobacter spp* van de condiciones de crecimiento anaerobias a resistencia a condiciones naturales de oxígeno, sin embargo la mayoría se consideran micro aerofílicas. En el caso de la temperatura de cultivo, estas presentan un rango muy amplio de 15°C en el caso de *Campylobacter cryaerophila*, de 41°C a 43°C para *C. jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lariidis*. Además de esto, es posible encontrar diferencias de temperatura de cultivo entre cepas de la misma especie al igual que en pruebas de inhibición, donde la tolerancia a las diferentes concentraciones puede ser de ayuda para su identificación. La diversidad en los hábitats dificulta también su estudio. <sup>3</sup> El género *Campylobacter* cuenta con 14 especies, entre las cuales se encuentra *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. helveticus* clasificadas en el grupo de las termofílicas. La especie más importante en este grupo, *C. jejuni*, es uno de los principales agentes infecciosos para los seres humanos. <sup>3</sup> *C. jejuni* es un patógeno que ha sido también asociado a enfermedades diarreicas en ganado bovino y ovino, así como abortos y septicemias en esas especies. <sup>7, 8</sup> En humanos su presencia ha sido demostrada desde los años 50's y solo en los últimos años, se ha considerado como etiología de padecimientos en el ser humano. El género *Campylobacter* se considera como una de las principales causas de enteritis bacteriana aguda en humanos por consumo de alimentos contaminados con este agente patógeno a nivel mundial. <sup>7, 9</sup> Las principales especies de *Campylobacter spp* responsables de inducir enteritis por infección por *Campylobacter* termotolerantes son *C. jejuni* en un 80 % de los casos y en segundo lugar *C. coli* con un 10 al 15 %, otras especies cómo *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. fetus* son menos frecuentes y dependen de la región del mundo donde se haga el aislamiento. <sup>7</sup> Algunos serotipos basados en la clasificación de antígenos somáticos termoestables “O” de *C. jejuni* <sup>10</sup> reportados son O:1, O:2, O:57, O:16, O:19, O:23, O:37, O:41, y O:44; donde O:19 es el más ampliamente reportado a

lo largo del mundo.<sup>11, 12</sup> Los signos clínicos observados en pacientes con enteritis por *Campylobacter spp* son por lo general en tracto digestivo, siendo diarrea uno de los más característicos, debido a que la infección es enteroinvasiva, esta puede llegar a producir colitis y trastornos sistémicos.<sup>7</sup> Una de las patologías asociadas al género de *Campylobacter spp*, es la denominada diarrea del viajero, que junto con *Escherichia coli*, representan un padecimiento muy común en viajeros.<sup>13, 14</sup> Dentro de los productos de origen animal contaminados con *Campylobacter spp*, se encuentran los de origen avícola y bovino.<sup>15, 16</sup> En especial la carne de pollo, se han identificado como principal fuente de contaminación de este enteropatógeno, por contaminación cruzada antes o durante el almacenamiento<sup>17, 18</sup> ya que se relaciona al mal manejo de estos productos animales antes o después de su cocción.<sup>7, 11</sup> Se estima que en países en vías de desarrollo como México, la presencia de la enfermedad es elevada, en especial en niños.<sup>11</sup> Un estudio en México demostró que alimentos listos para consumir presentaban contaminación por *C. jejuni* en un 41% de las muestras, un 19% *C. coli* y 40% otras especies de *Campylobacter spp*.<sup>19</sup> En aves como el pollo, la infección es considerada comensal, encontrando a *C. jejuni* en mayor concentración en mucosa de criptas del ciego hasta  $10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC) / g y en intestino delgado.<sup>20-23</sup> *Campylobacter spp* se propaga por ruta fecal-oral y coloniza a una dosis mínima de  $10^4$  UFC ciegos de pollos en un 100% de las aves, sin embargo la dosis infectante puede reducirse a menos de 40 UFC al ser transmitida de ave a ave,<sup>17, 22, 24</sup> su presencia también se reporta en órganos linfoides,<sup>25</sup> siendo a las 2 semanas de edad del pollo el momento más frecuente de colonización en el tracto digestivo,<sup>26</sup> llevando un cuadro asintomático hasta el momento de sacrificio, cuando se da la contaminación de hasta un 30 % de las canales con alrededor de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g de *C. jejuni* presente en las heces.<sup>17, 20</sup> La transmisión se considera horizontal pero la vía vertical se propone como otra posible ruta de colonización de *Campylobacter spp*, siendo las aves silvestres, animales de granja y otros posibles reservorios.<sup>17</sup> En el caso de contaminación cruzada en el momento del sacrificio es probablemente debida a la presencia de parvadas de diversas casetas, lo que hace que las instalaciones y equipo se contaminen fácilmente. El empleo de agua contaminada con *Campylobacter spp* es una de las principales fuentes de colonización en parvadas. La presencia de *C. jejuni* en otras especies es frecuentemente reportada siendo estos también reservorios de esta.<sup>7</sup> En el paciente con enteritis por *C. jejuni*, la infección en la mayoría de los casos auto limitante,<sup>27</sup> sin embargo en el caso de infecciones sistémicas el empleo de antibióticos es necesario.<sup>7</sup> El

efecto de estos se puede ver disminuido gracias a la aparición de cepas resistentes a antibióticos como los macrólidos, las fluoroquinolonas, ampicilina, ácido nalidixico, ciprofloxacina, y tetraciclinas.<sup>1, 7, 13, 14</sup> Además del cuadro digestivo observado en la infección con *Campylobacter spp*, se reporta la presencia de manifestaciones clínicas pos-infección como artritis, urticaria y eritema nodoso. Dentro de esas complicaciones que se presentan se encuentra el síndrome de *Guillain-Barré* (GBS),<sup>7, 11, 12, 27, 28</sup> caracterizado por una desmielinización aguda que afecta a sistema nervioso periférico. El GBS es un desorden auto inmune del sistema nervioso periférico, caracterizado por una parálisis flácida periférica, donde la previa infección con *Campylobacter spp* es frecuentemente reportada.<sup>12, 29, 30</sup> En el GBS, una respuesta inmune es inducida debido al mimetismo que existe entre los gangliósidos del sistema nervioso periférico y los lipo-oligosacáridos de *C. jejuni*, durante la fase aguda es posible encontrar en suero títulos elevados de inmunoglobulina G (IgG) contra los gangliósidos GM1, glicolípidos abundantes en el sistema nervioso periférico, al decrecer estos IgG se observa la recuperación paulatina del paciente.<sup>29, 31</sup> Se estima que de cada 3,000 casos de *C. jejuni* en seres humanos 1 desarrollara GBS, siendo estos lipo-oligosacáridos un factor importante para la presentación de GBS y sus complicaciones clínicas,<sup>7, 29, 32</sup> debido a esto, la infección por *Campylobacter spp* es considerada como un problema de salud importante.<sup>7</sup> El empleo de medidas sanitarias, programas de desinfección y de calidad durante el manejo de alimentos, así como en plantas de sacrificio, resultan ser útiles en su control.<sup>7</sup> Aun siendo considerada comensal, al ser administrada a los pollos, *C. jejuni* induce un aumento de inmunoglobulina secretoras (sIgA) en bilis, los cuales modifican su capacidad de colonización,<sup>33, 34</sup> a pesar de esto, la administración de cultivos inactivos de *C. jejuni*, así como antígenos de superficie no han sido capaces de inducir una respuesta inmune que reduzca considerablemente la colonización de esta.<sup>33, 35</sup> Otras medidas empleadas son el uso de aditivos como el ácido caprílico tanto en aves como en otras especies, en porcentajes de 0.7 a 1.4 % de la dieta, resulta ser una medida de control para *C. jejuni*, las reducción de la colonización en tracto digestivo de aves jóvenes,<sup>36, 37</sup> al igual que el empleo de bacterias como *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* y *E. coli* que reducen la presencia de *C. jejuni* en el tracto digestivo mediante el proceso de exclusión competitiva y la producción de compuestos antimicrobianos con actividad similar a los ionoforos,<sup>38</sup> como las bacteriocinas que impiden el desarrollo de ciertos tipos bacterianos,<sup>39, 40, 41</sup> al inducir cambios en la membrana celular permitiendo una pérdida

de la fuerza protón motriz por la disipación del potencial eléctrico transmembranal y el gradiente de pH transmembranal.<sup>42</sup> El empleo de agentes biológicos como ciertos bacteriófagos para el control de *C. jejuni* en aves resultan efectivos en ciertas condiciones, ya que si bien las bacterias son afectadas, su adaptación a estos puede llevar a una resistencia, reduciendo así su efecto.<sup>43</sup> El estudio de proteínas asociadas a membranas para la diferenciación de especies de *Campylobacter spp*, ha llevado a su vez a su estudio como posibles antígenos para su diagnóstico y como empleo como vacunas. Una de estas proteínas de membrana, MAPA, la cual ha demostrado ser efectiva para la diferenciación de *C. jejuni* de otras especies de *Campylobacter spp*, inclusive de *C. coli*.<sup>44</sup> Otros antígenos de superficie como los flagelares (PEB1, PEB3),<sup>45, 46</sup> han sido estudiados para su empleo en el diagnóstico y prevención de la infección con *Campylobacter spp*, sin embargo, estos antígenos presentan variaciones entre cepas y especies.<sup>47</sup> Otra de las proteínas de superficie con función antigénica en el caso de *C. jejuni*, es la denominada Omp 18 de 165 residuos de aminoácidos (aa's), la cual pertenece a la familia de las lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (PAL), el estudio del gen codificante para la Omp 18 demuestra la presencia de una sola copia del gen en el genoma bacteriano del grupo de las termofílicas incluida *C. jejuni*,<sup>48</sup> esta secuencia única posee su propia región promotora, un marco de lectura abierto (ORF) de aproximadamente 498 nucleótidos que codifica para una proteína de 165 aa's de un peso de 18 kDa, el cual comienza en la posición 129 a 131 y termina en la posición 624 a la 626,<sup>2, 3</sup> las similitudes que presenta la Omp 18 con otras PAL va entre un 32% a 36%,<sup>2, 48</sup> además de ser accesible a inmunoglobulinas (Ig) específicas y compartir secuencias específicas presentes en este tipo de moléculas de superficie bacteriana.<sup>48, 49</sup> Debido al uso de PAL como inmunógenos contra infecciones producidas por bacterias Gram negativas, por presentar alta inmunogenicidad y conservación entre cepas,<sup>50, 51, 52</sup> el empleo de epítomos de la proteína Omp18 de *C. jejuni*, resulta un posible inmunógeno para el control de esta bacteria.<sup>53</sup>

## **Influenza aviar**

La influenza aviar (IA) es una enfermedad viral que va de signos respiratorios y digestivos, baja de postura, hasta mortalidad cercana al 100 %, donde factores como especie del hospedador, edad, sexo, infecciones oportunistas, inmunidad conferida y factores ambientales modifican su presentación.<sup>1</sup> Entre los nombres con que se conoce

a la IA de alta patogenicidad (HP) se encuentran plaga aviar, peste aviar, gripe aviar, entre otros.<sup>1, 54</sup> Su historia en la avicultura se puede resumir en tres partes, los primeros reportes de virus de IA (vIA) de HP, reconocimiento de los vIA de mediana o baja patogenicidad (LP) en pollos domésticos y la identificación de los vIA asintomáticos en aves salvajes, posteriormente clasificándose en aves *gallinaceas* (pollo y pavo) en vIA de HP y vIA de LP.<sup>55</sup> La clasificación del vIA se basa en la secuencia de la proteína HA y su sitio de separación proteolítica, de acuerdo a la organización mundial de la salud animal (OIE), sin embargo su clasificación basada en los signos clínicos resulta más práctica en brotes de campo.<sup>56</sup> En general las cepas del vIA de HP son capaces de presentar una mortalidad de por lo menos el 75% hasta un 100%. Las cepas de vIA de LP se consideran aquellas que se encuentran fuera de este rango.<sup>56, 57</sup>

En brotes de vIA de LP en pollos y pavos, se registran alteraciones en sistema respiratorio, digestivo, urinario y reproductor, además de signos clínicos.<sup>1</sup> La morbilidad se considera elevada y la mortalidad baja con la presencia de patógenos oportunistas como *Mannhemia hemolitica* y *E. coli*,<sup>1, 58</sup> entre las lesiones macroscópicas se encuentran principalmente en tracto respiratorio así como en cavidad peritoneal y postura interna con alteraciones en tracto reproductor y en huevo.<sup>1</sup> Entre las lesiones microscópicas se observa neumonías fibrino-celular, traqueitis, bronquitis, depleción linfoide por necrosis y apoptosis en bolsa cloacal (BC) y otros tejidos linfoides del ave.<sup>1</sup> En infecciones por vIA de HP, los signos clínicos en *galliformes* van de muerte súbita sin la presencia de signología clínica por lesiones severas en órganos internos, sistema cardiovascular y sistema nervioso, en aves sobrevivientes a los 3 días o más de infección presentan signología clínica nerviosa, así como en general signología clínica inespecífica, en aves productoras de huevo y reproductoras, la postura baja hasta llegar al cese, siendo la mortalidad lo más característico de un brote, la cual se encuentra en un rango de 50% a 89% llegando hasta de un 100%.<sup>1</sup> Entre las lesiones macroscópicas en vIA de HP en aves que no mueren en los primeros días del brote se observan lesiones hemorrágicas a necróticas de vísceras y piel, edema subcutáneo con presencia de petequias, vísceras con hemorragias, necrosis focal en su superficie y parénquima del órgano, necrosis multifocal en placas de Peyer (PP), páncreas, bazo, corazón, hígado, riñones, órganos linfoides primarios (OLP) y órganos linfoides secundarios (OLS), por lo que BC y timos se encuentran atróficos, en cerebro se observa meningoencefalitis linfocítica con focos de glíosis, necrosis neuronal, neurofagia, edema y hemorragia. Se observa daño en tejido muscular, células

endoteliales y renales por necrosis. La presencia de microtrombos en capilares y pequeños vasos sanguíneos de la piel es frecuente, así como vasculitis, perivasculitis, edema subcutáneo y necrosis de endotelio de capilares.<sup>1</sup> En general la diferencia entre los vIA de HP y LP es que los HP conllevan a una infección sistémica y los LP se presentan con una infección localizada en sistema respiratorio ó tracto digestivo, siendo los vIA de HP principalmente conformados con hemaglutininas (HA) H5 o H7 como subtipos.<sup>55, 59, 60, 61</sup> El periodo de incubación va de un par de horas hasta días, lo que dependerá por mucho de la dosis viral, la ruta de exposición, la especie expuesta al virus y a la detección de signos clínicos,<sup>1</sup> su transmisión puede ser directa o indirecta por contacto con secreciones nasales de aves infectadas así como sus excretas.<sup>1</sup> Los virus de Influenza (vI) son clasificados en géneros de acuerdo a reacciones serológicas de proteínas como NP ó la proteína matriz M1 (M1),<sup>17</sup> siendo tres tipos virales, A, B, y C, donde vIA pertenece al tipo A, los tipos B y C no han sido aislados en pollos.<sup>55</sup> Una subclasificación del vIA basada en reacciones serológicas de HA y neuroaminidasas (NA), describe 16 HA y 9 NA reconocidas,<sup>55, 62, 63, 64</sup> de las cuales, la mayoría de las combinaciones de HA y NA se ha observado en los vIA aislados en pollos y aves salvajes.<sup>60</sup> La clasificación de HA y NA por pruebas de serotipificación de vI en especies como aves, porcinos, caballos y aislamientos en seres humanos,<sup>60, 65, 66</sup> así como pruebas de inmunoabsorcancia ligada a enzimas (ELISA) y virus suero neutralización, se considera pruebas estándares para la identificación y establecimiento de relaciones inmunogénicas detalladas entre aislamientos.<sup>1, 67, 68</sup> El estudio de los genes de vIA permite además su clasificación en linajes por zonas geográficas a nivel mundial.<sup>55, 69, 70</sup> El conjunto de esta información permite el desarrollo de una nomenclatura internacional estándar para los vI, designando a cada aislamiento un nombre.<sup>60</sup>

El vIA pertenece a la familia de los *Orthomyxoviridae* género Influenzavirus tipo A,<sup>55, 71</sup> su virión presenta una forma esférica, pleomorfica o filamentosa y una nucleocápside con simetría helicoidal, con un diámetro de 80 a 120 nm pudiendo ser mayor en el caso de la forma filamentosa. La superficie exterior del virus esta cubierta por dos tipos de glicoproteínas proyectadas hacia el exterior de aproximadamente 10-14 nm de longitud y 4-6 nm de diámetro, trímeros alargados con forma de vara denominadas HA y tetrameros con forma de hongo denominadas NA.<sup>71</sup>

El vIA resulta ser sensible al calor, pH extremos, condiciones no isotónicas, a la desecación, a solventes orgánicos, detergentes, aldehídos, hipoclorito de sodio, fenoles,

iones de amonio, siendo más sensible en caso de no estar protegido por materia orgánica ó por condiciones ambientales como humedad alta y bajas temperaturas,<sup>72, 73</sup> por lo que en estas condiciones el vIA puede permanecer activo desde 7 hasta 100 días.<sup>1</sup> Su conservación se recomienda a temperaturas de -70°C así como en condiciones de liofilización y con menor efectividad a 4°C en líquido alantoideo una vez inactivado con formalina, etilenimina binaria y beta propiolactona sin alterar la actividad de HA y NA virales.<sup>74</sup>

El vIA posee un genoma de ácido ribonucleico (ARN) cadena sencilla de sentido negativo (vARN (-) ss) con 8 segmentos, los cuales codifican para 10 proteínas:<sup>55, 62</sup> PB1 con función de transcriptasa, PB2 con función de endonucleasa, PA con actividad proteolítica y con participación en la replicación viral,<sup>1</sup> estas en conjunto forma parte del complejo ribonucleo proteína (RNP), una ARN polimerasa dependiente de ARN, el cual está integrado en el virus por el vARN(-)ss, la proteína NP y la RNP;<sup>55, 75</sup> la proteína denominada HA, una glicoproteína de membrana integrada con la función de unión del virión a los receptores de membrana sialiloligosacáridos de las células infectadas, hemoaglutinación, fusión de la envoltura viral, así como neutralización viral mediada por Ig; la proteína NA, glicoproteína de membrana con funciones de enzima degradante del receptor celular (residuos de ácido siálico o SA) induciendo la elusión del virus, también responsable de la neutralización de la propagación viral mediada por Ig; dos proteínas no estructurales, NS1 ó proteína de unión al ARN, la cual inhibe el procesamiento del ARN mensajero (mARN) celular, aumenta la transcripción del mARN viral, se postula su participación en la inhibición de rutas de síntesis de interferón, además de la proteína no estructural NS2, proteína transportadora nuclear, encargada también del transporte del RNP al núcleo, dos proteínas de la matriz, la proteína M1 la cual conforma una estructura no glucosilada ubicada por debajo de la envoltura viral con la función de conformación viral y la proteína matriz 2 (M2), proteína membranal glucosilada, la cual conforma en la superficie del virión canales de iones. En conjunto, estas proteínas corresponden aproximadamente a un 70% de la partícula viral, junto con lípidos 20%, carbohidratos 5 al 8 % y ARN de un 0.8 a 1%.<sup>1, 62</sup> Los mecanismos por medio de los cuales el vIA ejerce su efecto patológico son dos, por necrosis debido a la intensa replicación<sup>76-82</sup> y por apoptosis.<sup>76-79, 83-87</sup> Su transmisión en poblaciones de aves silvestres es por vía oral-fecal, atribuida a la contaminación de aguas por virus,<sup>88, 89</sup> observándose una primera replicación en tracto digestivo,<sup>90</sup> con una eliminación del virus en concentraciones altas, llegando a un título

de  $1 \times 10^{7.8}$  dosis letal a embrión de pollo (ELD50) por gramo de heces.<sup>91</sup> El ciclo de replicación inicia al penetrar en la célula huésped por endocitosis mediada por la unión de HA con los receptores de superficie que presentan SA, derivado del ácido neuroamínico. El SA puede corresponder al ácido N-acetil neuroamínico (NeuAC) o al ácido N-glicolil neuroamínico (NeuGC) unido a una galactosa; el tipo de ácido así como su distribución y sitio de unión del SA varía de especie a especie, lo cual indica cierta especificidad de unión de HA.<sup>92, 93</sup> Una vez dentro de los endosomas, se da la separación proteolítica de HA en HA1 y HA2,<sup>59</sup> para después ser transportada a la nucleocápside hacia el núcleo donde el complejo RNP comienza la síntesis de seis mARN virales monocistrónicos, los cuales son traducidos a las proteínas HA, NA, NP, PB1, PB2 y PA, en el caso de los mARN correspondientes para los genes NS y M, estos son sometidos al proceso de *splicing* y traducidos en las proteínas NS1, NS2, M1 y M2.<sup>1</sup> Además de participar en la unión con los SA, la HA junto con la NA son los principales sitios de neutralización viral mediada por Ig aunado a su actividad de unión<sup>1</sup> y actividad enzimática<sup>94</sup> respectivamente. Se sabe de la importancia de la HA, en especial del sitio de reconocimiento de las proteasas para la patogenicidad de los vIA de HP y LP,<sup>95</sup> ya que el proceso de separación en HA1 y HA2 resulta esencial para la replicación viral del vIA, siendo el tipo y distribución en los tejidos de la enzima responsable de la separación proteolítica una característica para las cepas de HP y LP.<sup>58, 95-103</sup> Esto hace que la capacidad de daño y afinidad por especie varíe entre cepas vIA,<sup>91-95, 97, 98, 104, 105</sup> así como permitir establecer relaciones filogenéticas y clasificación del vIA.<sup>106, 107, 108, 109</sup> Su adaptación a especies como pollos y pavos parece ser un evento asociado a la aparición de los vIA de HP en aves silvestres,<sup>92-95, 97, 100, 101, 110, 111</sup> siendo las HA tipo H5 y H7 las que presentan mayor probabilidad de presentarse en los vIA de HP.<sup>100, 112</sup> Cambios en el genoma permiten a los vI adaptarse a diversos hospedadores e incluso ser transmitidos entre especies.<sup>55, 61</sup> A pesar de esto, los vIA al ser inoculados de manera experimental en mamíferos, no son capaces de replicarse de manera eficiente.<sup>113</sup> Las frecuentes variaciones antigénicas del vI son atribuidas a dos procesos conocidos como “drift & shift”, el proceso de drift o deriva se debe a la capacidad de generar un alto grado de diversidad genética de los virus ARN, siendo estas mutaciones puntuales acumuladas responsables de los cambios observados en las secuencias codificantes de las proteínas HA y NA.<sup>68, 111, 112, 114, 115</sup> Estos procesos no son exclusivos de HA ó NA, por lo que es posible su presentación en el resto del genoma viral,<sup>116</sup> lo cual permite una

alta adaptabilidad del vI así como su capacidad de evadir el sistema inmune por los cambios antigénicos.<sup>55</sup>

Debido a que IA es considerada un problema global por su presencia en continentes como África, Asia, Australia, Europa y América<sup>57, 58, 60, 63, 64, 68, 69, 70, 79, 88, 109, 110, 111, 112, 116</sup> e inclusive evidencia serología de infección en aves del antártico, su prevención y control requiere de la cooperación internacional.<sup>117, 118</sup> En el caso de México, hasta el 1 de abril del 2009 se considera presente la enfermedad en parte del territorio nacional, siendo consideradas estas zonas como en erradicación.<sup>119</sup> Un gran número de aves son susceptibles a la infección con el vIA,<sup>1</sup> siendo las acuáticas como las *Anseriformes*, (patos y gansos) y *Charadriiformes* (gaviotas y aves costeras), las de mayor relevancia para su transmisión y reservorio,<sup>116</sup> esto debido a que los vIA de LP no suelen provocar signología en este tipo de aves de vida libre, en especial en aves *Anseriformes*,<sup>61, 63, 64, 69, 82, 88, 89, 90, 91, 111, 117, 118, 120</sup> la transmisión del vI de un hospedador natural a otra especie aviar así como a una especie de mamífero se considera posible.<sup>1, 116</sup>

En México, la IA se encuentra bajo control epidemiológico por parte del gobierno mexicano, bajo el seguimiento de instituciones como la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), y la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas en los Animales (CPA). El texto de referencia en el territorio nacional se considera la Norma Oficial Mexicana (NOM), (NOM-044-ZOO-1995), Campaña Nacional contra la Influenza Aviar así como su modificación (11-17-98 Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995) Campaña Nacional contra La Influenza Aviar, donde la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), precipitación en gel de agar (PAG) y el aislamiento viral son pruebas de diagnóstico.<sup>121, 122</sup> Al unirse las HA del vIA a proteínas de superficie con SA de los eritrocitos aviares y mamíferos, permite una práctica técnica de laboratorio, la hemaglutinación, la cual mediante el uso de Ig específicos contra un vIA permite su estudio más específico en la prueba de HI. Del mismo modo, la prueba de inhibición de la neuroaminidasa (NI) permite la identificación del tipo de NA presente en el vIA,<sup>55</sup> facilitando el diagnóstico diferencial.<sup>1, 123</sup>

La vacunación y medidas de bioseguridad son la principal estrategia para el control de IA. En el presente, las vacunas no pueden proteger contra muchos serotipos debido a que los pollos son susceptibles a cualquier serotipo de los 16 HA conocidos,<sup>55, 56</sup> en el caso de la NA, aquellas Ig producidas contra un tipo de NA son capaces de conferir

protección a las aves,<sup>124</sup> sin embargo estas Ig no protegen contra todas las NA presentes en los diferentes virus, al igual que Ig contra otras proteínas internas como la NP, ya que estos no son capaces de proteger a las aves ante retos virales,<sup>125</sup> por lo que las medidas de bioseguridad como la desinfección de utensilios, botas, vehículos, limpieza y desinfección de instalaciones, eliminación de excretas, etc. son una herramienta más para reducir los riesgos de infección de las parvadas.<sup>1</sup>

El empleo de vacunas basadas en virus inactivados han sido una herramienta útil para prevenir signología clínica y mortalidad en diversas especies, pero esta es solo para la HA y NA en la cual se basa esta vacuna, por lo que una protección contra todos los subtipos no resulta práctico en una parvada. Sin embargo, al darse un brote y caracterizar al vIA, es conveniente la vacunación contra ese subtipo presente en la granja.<sup>1</sup> En México el empleo de estas vacunas de virus inactivado es aprobada solo en algunos estados de la republica, así como también bajo la autorización y vigilancia de la SAGARPA.<sup>121, 122</sup> En el caso de la vacunación contra vIA con H5 o H7, el control es mayor, debido al riesgo del surgimiento de vIA de HP por vacunación.<sup>1</sup>

En la actualidad, el estudio de la genética y proteómica del vI<sup>126, 127, 128, 129</sup> han permitido el desarrollo de estrategias donde la estos conocimientos resultan útiles para su control.<sup>130, 131</sup> El conocimiento de la estructura proteica viral ha permitido el diseño de bloqueadores de HA del vI,<sup>132, 133, 134</sup> así también la expresión de proteínas virales como HA del vI para la vacunación en vectores como *E.coli*,<sup>135, 136, 137</sup> plantas,<sup>138</sup> células mamíferas,<sup>139</sup> y vacunas ADN basadas en plasmidos codificantes para HA del vI.<sup>140</sup> El empleo de virus como vectores para proteínas del vI resultan ser un enfoque novedoso para abordar el problema,<sup>141</sup> entre estos vectores podemos encontrar el baculovirus como vector para HA, NA y M1 del vIA,<sup>142</sup> el virus de la enfermedad de Newcastle como vector para HA,<sup>143, 144, 145</sup> adenovirus como vector para HA del vIA,<sup>146, 147</sup> virus de viruela aviar como vector para HA y NA del vIA,<sup>148, 149, 150, 151, 152</sup> así como viruela aviar como vector para HA y NP,<sup>125</sup> herpesvirus de pavo (HVT) como vector para HA del vIA,<sup>153</sup> el virus de estomatitis vesicular como vector para HA del vIA,<sup>154</sup> el virus de laringotraqueitis aviar (vLT) como vector para HA y NA del vIA,<sup>155, 156</sup> el virus de viruela del canario como vector para HA del vI de equinos para la inmunización en perros,<sup>157</sup> así como el empleo de vIA con modificaciones en su genoma<sup>158, 159</sup> las cuales modifican su capacidad de replicación en células aviares así como su capacidad de unión a células mamíferas. Estos trabajos han demostrado su

efectividad en retos de laboratorio con vIA de HP con H5 así como H7 en aves, así como en modelos mamíferos.

El empleo de partículas parecidas a virus (VLP's) del vIA <sup>160, 161, 162, 163</sup> en ratones demuestran ser una opción a la vacunación con otros vectores de expresión; este modelo ha sido explorado en el área de expresión de proteínas en plantas, siendo inmunológicamente similar a lo observado en virus nativos así como presentar una protección ante retos virales de HP en ratones. <sup>164, 165, 166</sup> Estos trabajos han demostrado inducir protección contra el vIA con HA tipo H5 ó H7, sin embargo estos resultan de igual manera son efectivos contra la HA a partir de la cual fue diseñada la vacuna. <sup>167, 168</sup> Existen reportes del empleo de plásmidos codificantes para ARN pequeños de interferencia, los cuales se enfocan a las secuencias codificantes para las RNP, NP, PA, siendo estas secuencias efectivas para el bloqueo de la replicación viral del vIA en células aviares, <sup>169</sup> sin embargo su manejo y aplicación en campo resulta difíciles debido a la naturaleza del tratamiento.

El empleo de modelos como *Salmonella typhimurium* para el transporte de vacunas ADN como vector para HA del vIA, sea en pollo o en ratones, demuestra ser otra estrategia efectiva para la vacunación en campo contra IA. <sup>170</sup> Una estrategia mas empleada para el mejoramiento de las vacunas contra el vI es el desarmado viral. <sup>171</sup> La investigación con el vIA ha llevado al desarrollo de vacunas basadas en el ectodominio de la proteína M2 del vI (M2e), el cual tiene la función de canal de iones; <sup>172</sup> la M2e es altamente conservada en todos los vI tipo A, poco presente en las partículas virales pero en abundancia en las células infectadas. <sup>172-175</sup> Estudios indican que mediante el uso de M2e, es posible reducir la mortalidad y signología clínica en infecciones de vI de HP en especies como ratones. <sup>172, 174, 175</sup> Su empleo en partículas transportadoras como el núcleo antigénico del virus de hepatitis B (HBcAg), resultan altamente inmunogénicos y ser capaz de inducir una respuesta humoral protectora contra cepas de HP en especies como ratones, en algunos casos con adjuvates. <sup>173, 176, 177, 178</sup> El canal de protones de los vI conformado por el homotetramero de M2, debe de funcionar para que se de la replicación viral, <sup>179</sup> sin embargo se reporta que su participación no sea del todo necesaria en algunos casos. <sup>180, 181</sup> La proteína M2 presenta un ectodominio N-terminal, un único dominio transmembranal y una cadena C-terminal citoplasmático, donde el dominio transmembranal actúa como secuencia de señalización y anclaje a la membrana citoplasmática durante su síntesis proteica en la célula infectada. El dominio membran

consta de 20 aa's, el dominio N-terminal consta de 23 aa's y el dominio C-terminal esta conformado por 53 aa's.<sup>181</sup> La parte interna del dominio transmembranal participa en el transporte de protones,<sup>181</sup> asi como determinante para la sensibilidad ante antivirales<sup>182</sup> como la amantadina y su derivado rimantidina.<sup>179, 181</sup> Se cree que el pH bajo del interior del virión debilita las interacciones entre las proteínas M1 y la RNP del vI, liberando asi a la RNP. En presencia de amantidina, la liberación de la proteína M1 de la RNP es incompleta.<sup>179</sup> En la parte interna de una estructura en forma de hélice formada por la M2 se encuentran los aa's que interactúan directamente con el medio acuoso, teniendo estos una alta importancia para el funcionamiento adecuado del canal de iones. Aunado a la selectividad, el paso de estos iones también puede ser controlada, activando y desactivando así el canal de iones.<sup>181</sup> El momento en el que el canal de iones participa en el proceso de infección del vI se lleva a cabo cuando el virión se encuentra contenido en el endosoma, sin embargo en algunos cepas del vI tipo A, la proteína M2 también manipula el pH del aparato de Golgi durante su transporte en su ruta de exocitosis,<sup>181</sup> manteniendo el pH por debajo del umbral en el que la HA presentan cambios conformacionales inducidos por pH bajos con la finalidad de prevenir cambios conformacionales prematuros en la HA.<sup>179</sup> Diversos estudios demuestran que en especial una secuencia reacciona con Ig contra M2e, esta secuencia corresponde a E-V-E-T-P-I-R-N.<sup>183</sup> Lo que indica que esta secuencia de 8 residuos (aa's 6-13) puede estar relacionada directamente a la inmunidad contra el vI.<sup>184, 185, 186</sup> Esta secuencia es también posible encontrarla en los vIA como E-V-E-T-P-T-R-N, así como E-V-E-T-L-T-R-N, sin embargo los anticuerpos monoclonales contra la secuencia E-V-E-T-P-I-R-N pueden reconocer pobremente la secuencia E-V-E-T-P-T-R-N pero fallan en el reconocimiento de la secuencia E-V-E-T-L-T-R-N.<sup>187, 188</sup> Reportes en especies como ratones y cerdos indican que la respuesta inmune hacia M2e tiende a ser una respuesta celular mediada por Ig contra M2e, caracterizada por células natural killer (NK), induciendo un efecto de destrucción de células infectadas,<sup>189, 190</sup> debido a la presencia en mayor cantidad de M2e en las células infectas que en el vI.<sup>191</sup>

### **Partículas parecidas a virus**

A diferencia de los virus con nucleocápsides de mayor complejidad como los clasificados en familias *Poxviridae* y *Retroviridae*, la mayoría de los virus cuentan con proteínas estructurales con dos simetrías básicas, helicoidal o icosaédrica, dando forma

de vara o esférica al virus respectivamente.<sup>192</sup> Estas proteínas poseen capacidad de organizarse por si solas en estructuras macromoleculares (cápsides) llamadas VLP's,<sup>192</sup> las cuales se pueden encontrar, en un rango de tamaño de 22 a 150 nm,<sup>193</sup> similares al tamaño observado en virus al ser expresadas de manera individual en diferentes organismos.<sup>172, 194- 198</sup> Estas proteínas no son infectivas ya que carecen de un genoma viral y no representan ningún riesgo a diferencia de las vacunas de virus activos.<sup>192, 193</sup> Debido a su naturaleza antigénica, su actividad biológica ante células presentadoras de antígeno (APC), así como por su tamaño, el cual en algunos casos, se encuentra cercano a 40 nm, corresponde a un tamaño óptimo para la captación de antígenos por parte de las células dendríticas (DC).<sup>199, 200</sup> Los VLP's son una opción para la vacunación al servir como una plataforma para epítomos de agentes patógenos expresados en su superficie, en lugar de solo administrar ectodominios solubles como vacunas.<sup>192, 193, 194, 201</sup> Actualmente trabajos demuestran que el empleo de VLP's en animales como ratones así como en humanos, ya sea por vía oral, intranasal o inyectada resultan en una respuesta inmune sistémica y en mucosas.<sup>172, 176, 193, 202-210</sup> Otra aplicación de los VLP's es su empleo como transporte de moléculas terapéuticas como vectores virales empleados como terapia génica y en vacunas ADN, explotando el tropismo natural de estas partículas.<sup>192, 209</sup> Se reportan diversos VLP's expresados en diversos sistemas entre los que encuentra el HBcAg.<sup>193</sup> Es en estos VLP's donde es posible mediante la combinación de las secuencias codificantes para estos epítomos<sup>172, 174, 176, 192, 193, 202-205</sup> ó por su combinación química la creación de la VLP's quimeras.<sup>192, 193</sup> Los VLP's quimeras consisten de una plataforma proteica unida a epítomos de uno o varios virus, con el núcleo estructural del VLP,<sup>194, 210</sup> la cual puede presentar epítomos de proteínas de patógenos, así como otras moléculas con diversas funciones.<sup>211, 212, 213</sup> Se conocen diversos VLP's quimeras, entre los que se encuentra el HBcAg.<sup>193</sup> El empleo de estos ha sido estudiado también en combinación con diversos adyuvantes,<sup>214, 215</sup> resultan un aumento de la respuesta inmune humoral y celular.<sup>216</sup> Entre estos adyuvantes orales se reportan toxinas bacterianas, las cuales pueden favorecer la efectividad de los VLP's en mucosas.<sup>176, 198, 217</sup> Debido a sus características, los VLP's resultan ser una vía de presentación de antígenos ante el sistema inmune, por lo que en el caso de la vacunación a gran escala, resultan ser un enfoque con muchas posibilidades, siendo el sistema biológico de expresión un determinante para lograr accesibilidad y practicidad en su elaboración.

## **Expresión proteica en plantas.**

La producción de VLP's en tejido vegetal, resulta ser una tecnología prometedora hacia el futuro de la vacunación, ya que si bien el empleo directo del tejido vegetal es una opción, la purificación y tratamiento de los VLP's expresado en plantas son posibilidades aplicables a las necesidades del investigador.<sup>192</sup> La expresión de VLP's diversos como la proteína de superficie del virus hepatitis B (HBsAg), la proteína mayor de la cápside L1 del virus del papiloma humano (HPV-L1), la cápside del virus de Norwalk (NVCP) han sido reportado en diferentes sistemas biológicos, entre los que se encuentran plantas como tabaco, tomate, papa, maíz y lechuga.<sup>192, 193</sup> Existen otros sistemas de expresión de VLP's como lo son levaduras así como el caso de *E. coli*, sin embargo presentan limitaciones y desventajas en la producción de proteínas con modificaciones pos-traducción, limitando su uso en algunos casos. En el caso de los sistemas de cultivos celulares de mamífero, a pesar de permitir las modificaciones apropiadas y un correcto ensamblado de las proteínas, al ser sistemas menos manejables y de mayor costo, su empleo no es una opción a gran escala.<sup>193</sup> El uso de las plantas como biofábricas o biorreactores mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética permite la expresión de proteínas como anticuerpos, biofarmaceuticos y vacunas, así como generar plantas con características como la resistencia a insectos, virus, hongos y herbicidas.<sup>192, 198</sup> Extendiéndose su uso debido a las ventajas para generar compuestos,<sup>192, 197</sup> tales como su potencial económico, ya que los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura industrial que se basa en el uso de sistemas de fermentación o en biorreactores, la tecnología para aprovechar su elaboración en escala industrial se encuentre disponible, no requiere de procesos de purificación del compuesto ya que la planta puede ser empleada como alimento, como en el caso de las vacunas comestibles, la producción de estos compuestos puede ser dirigido a compartimientos específicos dentro de la planta, aunado a que la producción del compuesto puede ser a nivel industrial e incluso es posible la producción de varios compuestos en la misma planta.<sup>192, 218</sup> Existen dos áreas en donde esta tecnología está teniendo un impacto importante, en la producción de anticuerpos y en la producción de compuestos biofarmacéuticos incluyendo antígenos.<sup>197, 198</sup> La expresión de antígenos en plantas tiene como propósito su conveniente administración oral y su mínimo procesamiento previo a esto, sin embargo, existen algunos problemas al considerar la vía oral como administración de una vacuna como la digestión de esta por el enzimas

digestivas y cambios de pH, su transporte hasta el sitio de interacción con el tejido linfoide asociado al tracto digestivo (GALT), su correcto procesamiento y presentación al sistema inmune, evitando ante todo un posible reacción de tolerancia al antígeno y su efecto detrimental ante una respuesta inmune protectora. Sin embargo a esto, los VLP's presentan la ventaja de superar estos inconvenientes e inducir una respuesta inmune en mucosas posterior a su administración oral, debido entre otras características, a su estructura compacta y altamente ordenada, los hace aumentar su resistencia a la degradación enzimática en el tracto digestivo y permitiendo su interacción con el sistema inmune por medio de las células M del GALT. Debido a su origen y conformación, los VLP's presenta una estructura similar a una partícula viral invasora, induciendo al sistema inmune a responder de manera semejante a una infección viral.<sup>202</sup> Si se asume que se requieren de más de diez miligramos de una vacuna de subunidad normal para su administración oral, (1,000 veces más de lo requerido en una vía inyectada)<sup>197</sup>, se podría considerar que se requerirían cientos de gramos de una planta para lograr una respuesta inmune, sin embargo es posible aumentar la concentración del antígeno al procesar el materia vegetal o por medio de tecnologías que permitirán aumentar la expresión de estas proteínas en las plantas.<sup>197</sup> La expresión de antígenos en plantas, permite a su vez obtenerlo encapsulado de manera natural en el tejido de la planta, esto previene la degradación del antígeno al ser administrado de manera oral, permitiendo que este sea liberado gradualmente en el tracto digestivo. Esta protección hace que también que se reduzca la cantidad de proteína requerida para su administración oral. Aunado a esto, como otro beneficio, la expresión en plantas presenta la ventaja del almacenamiento de estos antígenos en las plantas por un tiempo prolongado, sin daño a estas proteínas, como en semillas, lo cual elimina gastos de almacenamiento en refrigeración.<sup>197</sup> Actualmente se reportan varios métodos para la producción de proteínas exógenos en plantas, transformación del genoma nuclear, transformación del cloroplasto, e infección viral transitoria, de los cuales solo transformación del genoma nuclear y sistemas virales han sido empleados para la expresión de VLPs.<sup>192, 198</sup> La transferencia de ácido desoxiribonucleico (ADN), depende de lo que se busca mejorar en la planta, así como la especie a la cual pertenece está.<sup>192</sup> Los métodos directos van de la transfección del genoma de organelos, por electroporación, métodos químicos, micropuntura de células aisladas. Uno de los más comunes es el bombardeo de partículas o biobalística, empleada en plantas en las que no es posible el empleo de *Agrobacterium tumefaciens* como método de transferencia de

ADN.<sup>192</sup> En el caso de *A. tumefaciens*, un método indirecto, se emplea la capacidad de esta bacteria para transferir ADN exógeno a las células vegetales.<sup>219</sup> Las plantas que de manera natural son afectadas por *A. tumefaciens* incluyendo variedades de angiospermas y gimnospermas.<sup>192</sup> *A. tumefaciens*, una bacteria presente en la tierra, que al detectar una planta con una herida, se desplaza hacia la herida, se adhiere y comienza a transformar las células de la planta al inducirse la transcripción de genes de virulencia presentes en un plásmido específico denominado Tumor-inductor (Ti-ADN), el cual contiene el ADN de transferencia (T-ADN) que junto las proteínas de virulencia bacterianas expresadas por la bacteria (VirD1, VirD2, VirE2) inducen la transcripción, procesamiento de T-ADN, su exportación e integración al genoma de la planta. El T-ADN codifica para una hormona de planta que induce la producción de enzimas que estimulan el crecimiento de tumores y enzimas metabólicas encargadas de la producción de productos metabolizables solo por *A. tumefaciens*. Como resultado se genera un microambiente ideal para esta bacteria al formarse tumores en el tejido de la planta. Existen otras proteínas que participan en el sistema de secreción al formar canales membranales que permiten el paso del T-ADN.<sup>219</sup> Para la transferencia de ADN con *A. tumefaciens*, se requiere que el gen de interés sea insertado entre los bordes naturales del T-ADN presente en el plásmido original de la bacteria ó Ti-ADN para su inserción al genoma del núcleo de las células de las plantas.<sup>192, 219, 220</sup> La inserción aleatoria observada en este método, sugiere un mecanismo de recombinación no-homóloga, el cual aparenta ser el medio de inserción del T-ADN en los sitios de reparación del ADN genómico. Los sitios de integración del T-ADN presentan microsimilitudes en ambos lados de la secuencia del mismo y la secuencia en el sitio de inserción, las cuales deben de observarse a una distancia de entre 3 a 5 pb.<sup>219</sup> Desde los primeros experimentos para la elaboración de plantas transgénicas mediante el empleo de *A. tumefaciens* en 1983,<sup>192</sup> se han logrado grandes avances en el entendimiento del proceso de inserción del T-ADN. El empleo de otras técnicas de expresión como la transformación de organelos, como el cloroplasto, ofrece ventajas para la expresión de antígenos, incluyendo alta expresión, disminución del silenciamiento de los genes y reducción de contaminación de las poblaciones de plantas locales,<sup>197, 198</sup> sin embargo su uso se encuentra limitado a pocas especies, además de que la expresión en estos organelos no permite modificaciones pos-traduccionales de las proteínas.<sup>197</sup> El empleo de virus activos de plantas, al igual que el anterior método, resulta un método útil para la expresión de antígenos de interés en el citoplasma sin alterar el genoma de la planta, su empleo

permite la expresión en un lapso de 3 a 14 días,<sup>192, 197</sup> facilitando la producción en gran escala de la proteínas recombinante por su fácil inoculación y rapidez,<sup>197</sup> cual sea el caso es importante considerar las características de las proteínas deseadas, conformación y ensamblaje para determinar la técnica a ser empleada, así también la optimización de codones para la selección de un sistema de expresión adecuado a lo requerido.<sup>193</sup> En el caso de plantas, para alcanzar altos niveles de expresión se consideran varias estrategias, como la optimización de genes, promotores fuertes para un tejido específico, señalización sub-celular, fusión a transportadores estables, entrecruzamiento de plantas para una expresión homogénea y entrecruzamiento de líneas transgénicas con alta expresión,<sup>197</sup> todo con el propósito de mejorar rendimientos.

### **Núcleo de hepatitis B (HBcAg) como vector.**

Uno de los VLP's con los que se han experimentado, el HBcAg, ha sido probado como VLP's quimera y utilizado como vacuna intranasal e intraperitoneal en ratones.<sup>176, 192, 202, 221</sup> El virus de Hepatitis B pertenece a la familia *Hepadnaviridae* la cual incluye a virus hepatotrópicos, ADN doble cadena. Esta familia se divide en dos géneros *Orthohepadnavirus* (virus de hepatitis B de mamíferos) y *Avihepadnavirus* (virus de hepatitis B del pato),<sup>221</sup> su virión presenta dos polipéptidos en el gen codificante para su núcleo, al iniciar la traducción en el primer codón de iniciación, el resultado es la proteína denominada como antígeno “e” de hepatitis B (HBeAg), en el segundo codón de iniciación se codifica una proteína de 183 aa's de un peso de 21 kDa, con un tamaño de 30 a 32 nm,<sup>203</sup> el cual corresponde a HBcAg.<sup>222</sup> HBeAg y HBcAg se encuentran ligados en su estructura primaria.<sup>223</sup> Los monómeros de HBcAg, conforman dos tamaños de VLP's, integrados por 180 ó 240 subunidades con simetría icosaédrica.<sup>223</sup> La HBcAg tiene la función de encapsular el ADN viral, así como participar de manera importante en la maduración del virus, a diferencia de la HBeAg secretada, la cual no es necesaria para la replicación o para la infección.<sup>224</sup> Al parecer esta partícula secretada participa de manera muy importante para las infecciones crónicas y a la modulación de la actividad de los linfocitos T ayudantes (LTh).<sup>225</sup> El HBcAg resulta ser significativamente más inmunogénico en comparación con el HBeAg en términos de reconocimiento de LTh y en la producción de Ig, ya que el HBcAg no requiere de adyuvante para la producción de Ig en su evaluación en ratones. La inmunización

intraperitoneal con cantidades de apenas 0.006 µg de HBcAg en ratones con una solución salina resultan en títulos de 1:100 de Ig anti-HBcAg a las 2 semanas de una sola inyección, y hasta títulos de 1:1,600 con dosis de 0.025 µg de HBcAg y 10 µg de HBcAg en solución salina inducen títulos de 1:163,840.<sup>224</sup> Estos trabajos han demostrado que su empleo es capaz de inducir una respuesta inmune sistémica al ser administrado en ratones por separado por inmunización por mucosas<sup>226</sup> e intraperitoneal ante los virus contra los cuales se expresan sus epítomos, entre ellos M2e del vI expresado en HBcAg aplicado en ratones.<sup>172, 176</sup> Al igual que otros VLP's es posible la expresión de HBcAg en plantas,<sup>202</sup> llegando a un nivel de expresión en rangos de 10 a 50 µg/g de hoja liofilizada y de 24 µg/g a 2 mg/g de hoja fresca.<sup>192</sup> Para lograr una correcta expresión e inmunogenicidad es necesario considerar la posición en la cual son insertados los epítomos dentro de la secuencia codificante de ADN del HBcAg,<sup>204, 222</sup> ya que la posición central de los epítomos reduce la respuesta contra el HBcAg y a la vez permite una mejor respuesta a los epítomos foráneos insertados en el VLP,<sup>222</sup> la fusión del epítomo al N- terminal del HBcAg, a través de una secuencia de unión con HBcAg, resulta en una respuesta alta contra el epítomo insertado sin alterar la inmunogenicidad propia del VLP, mientras que la fusión al C- terminal de HBcAg permite al epítomo ser accesible a la superficie, pero no resulta en una inmunogenicidad tan alta como la observada en las otras dos posiciones.<sup>203</sup> La inserción en la parte interna entre el 75 aa's y 81 aa's, resulta en una mayor inmunogenicidad y antigenicidad contra el epítomo insertado,<sup>203, 222</sup> sin embargo el tamaño del inserto en esta posición se considera que debe de ser menor a los 45 aa's, en el caso de inserción en los C-terminal ó N-terminal del HBcAg permiten la unión de secuencias mayores de un rango de 90, 144 y hasta 720 aa's,<sup>204</sup> sin embargo no se alcanzan los mismos niveles inmunogenicos y antigénicos como se observa en la parte interna de HBcAg.<sup>203, 222</sup> Para su uso como VLP quimera no solo se debe de considerar la capacidad de inserción de HBcAg, si no también la secuencia primaria del epítomo insertado, ya que su secuencia puede ser determinante para lograr la conformación del VLP quimera.<sup>203</sup> Dentro de las características innatas del HBcAg se encuentran la inducción de una fuerte respuesta celular en ratón por parte de los linfocitos T (LT),<sup>227</sup> activación directamente a los linfocitos B (LB), ya que este es considerado tanto como un antígeno T dependiente, como un antígeno T-independiente en LT,<sup>224, 228</sup> su elevada inmunogenicidad, debida probablemente a su naturaleza polimérica y a la presencia en su estructura primaria de potentes epítomos para LTh y a la habilidad de activación directa a LB.<sup>223, 227</sup> Debido a

esto, su empleo como VLP's para la generación de una vacuna resulta de interés para las futuras investigaciones aplicadas en la generación de vacunas expresas en plantas.

### **Respuesta inmune en mucosas.**

El sistema inmune en aves en especial en mucosas, juega un papel muy importante para la defensa contra agentes patógenos cuya entrada o presencia en mucosas es un problema constante en los animales. Su conocimiento resulta útil para el desarrollo de vacunas para uso en estas especies, ya que existen una gran variedad de vacunas empleadas en la producción animal para la prevención y control de enfermedades propias de la especie, con diversos niveles de eficiencia de acuerdo a la intensidad con la cual el sistema inmune reacciona ante sus componentes.<sup>1</sup> Al igual que en los mamíferos, el sistema inmune depende de una compleja relación entre células especializadas y factores solubles, que al trabajar en conjunto confieren protección contra agentes patógenos.<sup>1</sup> En general, el sistema inmune de las aves presenta similitudes con el de los mamíferos, con algunas excepciones,<sup>229</sup> debido a que presentan órganos linfoides como BC y timo así como una amplia variedad de agregados linfoides como la glándula de Harder (GH), tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT) como el GALT, tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), tejido linfoide asociado a la cavidad nasal (NALT), tejido linfoide asociado a piel (SALT) y tracto genital, tonsilas esofágica (TE), tonsilas pilóricas (TP), placas de Peyer (PP), tonsilas cecales (TC), divertículo de Meckel (MD) así como tejido linfoide asociado a la glándula pineal.<sup>229</sup> Al igual que en mamíferos se sabe que la participación de las inmunoglobulinas A secretoras (sIgA), son en gran parte, la principal defensa contra estas infecciones;<sup>229, 230</sup> a pesar de esto la administración de antígenos vía parenteral en muchos casos son ineficientes para la inducción de sIgA.<sup>231</sup> Las Ig como las sIgA previenen la adhesión de patógenos como bacterias y virus limitando su efecto patógeno ó interactuando con el antígeno una vez que este a penetrado la mucosa, ya sea las sIgA ó inmunoglobulina M (IgM), neutralizándolo y facilitando su excreción al exterior evitando su efecto en la mucosa.<sup>232, 233, 234</sup> De acuerdo a esto, se esperaría una respuesta inmune de sIgA a la administración oral de una vacuna, lo cual en muchos casos no ocurre, ya que la presencia de sIgA es mínima o nula, aunado a que al aumentar la dosis de esta vacuna vía oral es posible inducir una respuesta nula ante una administración parenteral, contraria a la deseada, ante el mismo antígeno, denominada como tolerancia

oral,<sup>234-237</sup> por lo que una correcta presentación del antígeno en cuestión es crucial para lograr una producción de sIAg capaz de proteger al organismo como es el caso del vIA y bacterias colonizadoras como *C. jejuni*. El sitio el cual a de ser estimulado inmunologicamente es de importancia también ya que basados en los estudios en mamíferos de los patrones de migración y expresión de moléculas se propone que los linfocitos estimulados en el tejido linfoide nasal (NALT) y asociado a bronquios (BALT) pueden alojarse en la nariz, glándulas salivales y bronquios. En el caso de linfocitos B (LB) estimulados en las placas de Peyer (PP), se alojan principalmente en la mucosa del intestino delgado así como en tracto urogenital en menor cantidad participando en la protección de estos tejidos. En el caso de los LB estimulados en otros tejidos linfoides asociados tracto digestivo (GALT) como folículos solitarios en colon-recto y apéndice en mamíferos, migran hacia la mucosa del intestino grueso y al tracto urogenital.<sup>238-240</sup> Esto hace considerar al sitio crucial para el sitio donde los LB jugaran un papel en la inmunidad local a nivel de mucosas en especial en tracto digestivo.<sup>241</sup>

#### **CD40L (CD154)**

Entre estas moléculas receptoras de superficie relacionadas a la respuesta inmune se encuentra el receptor CD40, el cual pertenece a la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF), presenta funciones de estimulación del crecimiento celular, diferenciación, muerte celular, liberación de mediadores de la inflamación y en procesos inflamatorios crónicos.<sup>242-247</sup> El CD40 fue aislado en LB en todos sus estados de desarrollo, monocitos, células endoteliales y epiteliales, así como en DC en las que juega un papel muy importante para su maduración,<sup>248</sup> en trombocitos y macrófagos.<sup>249</sup> El CD40 es una glicoproteína fosforilada de membrana de un peso de 48 kDa hidrofóbica, con un dominio intracelular, un dominio intermembranal y un dominio extracelular con homología con otras moléculas de la familia del TNF-R.<sup>248</sup> El CD40L (CD154) es una glicoproteína de membrana de un peso 32 a 33 kDa, conformada por dos estructuras proteicas  $\beta$  plegadas similares a las observadas en otras moléculas de la familia de TNF. Este antígeno se expresa rápidamente en LT CD4+ activados, LTh0, LTh1, LTh2, en basofilos, mastocitos, eosinofilos, células NK, en monocitos y DC en menor frecuencia.<sup>243, 248-255</sup> Su expresión también ha sido observada en tejidos que se encuentran en procesos inflamatorios como en el caso de reacciones de rechazo trasplante,<sup>245</sup> esta también se puede encontrar de manera soluble, liberado por los LT

al ser estos activados,<sup>256</sup> mediante separación proteolítica de su dominio extracelular, conservando su actividad biológica, con un papel muy importante en la inmunidad adaptativa,<sup>248, 249, 250, 257</sup> por lo que la expresión de esta proteína resulta en su empleo como adyuvante para la mejora en la respuesta inmune ante la vacunación.<sup>251, 257</sup> En aves, el CD154 presenta funciones equivalentes como en mamíferos, teniendo un rol central en la respuesta inmune demostrando su presencia aun antes de la divergencia entre aves y mamíferos.<sup>258</sup> La interacción del CD40 y el CD154 en su forma soluble ha demostrado en aves, estimular diferenciación de LB inmaduros *in vitro*, aumenta la viabilidad de los LB, inducir la proliferación de LB, estimular la diferenciación de isotipos de Ig y de igual manera la producción de inmunoglobulina Y (IgY),<sup>259</sup> aunado a que la secuencia del gen TNFSF5 correspondiente al CD154 en aves ya se encuentra descrita.<sup>249, 259, 260</sup> La unión del CD40 y CD154, activa una serie de sistemas de segundos mensajeros, las cuales permiten la expresión genética responsable de los cambios celulares,<sup>248</sup> con efectos como la maduración de LB en células plasmáticas de larga vida,<sup>248, 251</sup> al reactivar la enzima telomerasa en LB de memoria, así también evita la inducción de apoptosis, selección y maduración de células de memoria, y estimula la producción y liberación de citosinas como interleucina (IL) 6, IL-10, TNF- $\alpha$ , CD80/86, favorece la expresión de moléculas de adhesión, receptores co-estimuladores y aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II.<sup>248, 249</sup> La unión de estos receptores en combinación con citosinas permite la correcta respuesta de los LB, como en el caso de producción de sIgA en las células plasmáticas, donde este estímulo junto con IL-10, el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), permite esta función.<sup>248, 249, 261</sup> Entre sus efectos biológicos reportados en mamíferos de la interacción de CD40/CD154 se encuentran el aumento de la supervivencia celular, aumento en la actividad tumoricida en monocitos, secreción de citosinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) y enzimas como la matriz metaloproteínasa (MMP), la cual participa en la liberación de ligandos como FASL, así como en la proliferación celular y migración.

Dentro de las células involucradas en la respuesta inmune, las DC, denominadas así debido a las largas extensiones de su membrana las cuales semejan las dendritas de las células nerviosas, tienen una función muy importante, la presentación de antígenos a los LTh. Este tipo de célula como característica general expresan el MHC II así como moléculas co-estimuladoras que interactúan con el LTh, por lo que estas células son más efectivas al presentar antígenos que los macrófagos y LB. Posterior a su contacto con el

antígeno, las DC migran a tejidos linfoides, <sup>229</sup> donde se da la presentación de los epitopos. En el caso de las aves, las DC presentan capacidades similares a sus homologas en mamíferos, <sup>262, 263</sup> una vez estimuladas a su maduración con CD154 ó lipopolisacáridos (LPS), su alta capacidad de presentación de antígenos se reduce y se da su migración. <sup>264, 265</sup> Al ser internalizado el antígeno es llevado al compartimiento multivesicular endosomal el cual se une a las vesículas contenedores del MHC II para su presentación ante los LT. <sup>264-267</sup> Se sabe que los receptores de las DC son capaces también de internalizar antígenos en ausencia de infección y presentarlos por medio del MHC I para inducir tolerancia por parte de LT CD8+ reactivos. <sup>268</sup> Las DC inmaduras, resultan ser una eficiente APC, debido a que estas requieren de concentraciones de antígeno entre  $10^3$  y  $10^6$  menores que otras APC. Al madurar estas células pierden la capacidad de absorber antígenos, al mismo tiempo aumenta la expresión de moléculas de superficie como los MHC II así como el CD40, CD54, CD58, CD80 (B7-1), CD83 y CD86 (B7-2) además de IL-12 y p55. <sup>229, 263</sup>

La estimulación CD40/CD154 en DC induce su migración a los centros germinativos (CG) y aumenta la supervivencia de estas células. En otros tipos celulares la expresión de estos marcadores celulares es normalmente baja. <sup>245- 249</sup> Otros efectos de la interacción de CD40/CD154 en la producción de IL-12 por parte de las APC, con la consecuente diferenciación de LTh0 y a su vez a LTh1 y LTh2. <sup>248, 249</sup> La interacción CD40/CD154 le confiere la habilidad a DC de activar LT CD8+. Se estipula que otras señales intercelulares como TNF- $\alpha$ , LPS o infecciones virales pueden sustituir la señalización del CD154. <sup>248</sup> La maduración de las DC se realiza bajo diversos estímulos, en su mayoría factores microbianos y productos de la inflamación, bacterias completas, LPS, citosinas como IL-1, GM-CSF, TNF-  $\alpha$ , CD154, CD80, CD86, envolturas virales, virus inactivados, sin embargo IL-10 bloquea este cambio celular, <sup>263</sup> haciendo de estas DC inmunotolerantes. <sup>261, 269</sup> Se ha demostrado que aun siendo DC maduras continúan con la capacidad de internación de antígenos mediada por receptores, haciendo de estas APC muy importantes en la respuesta inmune, sobre todo contra virus. <sup>269</sup> El control de la maduración de las DC parece ser la clave para la diferenciación entre una respuesta inmune innata a una respuesta inmune adaptativa, ya que de no estar correctamente estimuladas, las DC no favorecen esta respuesta, como se observa al administrar adyuvantes en el caso de algunos antígenos empleados como vacunas, los cuales resulta más inmunogénicos al estimular también a la inmunidad innata. Por lo que las DC resultan ser identificadores de infecciones o daños en el tejido. <sup>263, 270</sup> *In Vitro* las células

DC son capaces de inducir una respuesta inmune celular induciendo la proliferación y diferenciación de LT, estimulan a las células NK, así como LB, aumentan la expresión de moléculas de adhesión y co-estimulación para LT, proceso que permite el reclutamiento y permanencia de células linfoides en el tejido donde su presencia es requerida.<sup>270, 271</sup> La estimulación entre LT y DC se da en ambos sentidos, ya que la estimulación por parte de los LT activados así como LT de memoria con moléculas como el CD154 aumentan la supervivencia de las DC.<sup>263</sup> Las DC no solo participan en la activación de LT, de hecho son capaces de regular la tolerancia a ciertos antígenos propios del cuerpo.<sup>261, 272</sup> De cualquier modo, existe ciertos riesgos durante la presentación de antígenos por parte de las DC, debido a que no solo estas están expuestas a antígenos de patógenos, sin también a antígenos propios al fagocitar células moribundas y capturar proteínas del ambiente, las cuales no deben de ser inductores de una respuesta inmune, por lo que las DC inmaduras, en ausencia de un proceso infeccioso o inflamatorio, inducen tolerancia inmunológica a los antígenos inocuos.<sup>261, 273</sup> Su participación también se encuentra en la localización de la respuesta inmune, al promover moléculas que facilitan este evento, como las moléculas  $\alpha 4\beta 7$  integrina y CCR9 en los LT, marcándolos con un tropismo hacia el tracto digestivo.<sup>271, 274</sup> CCR9 y  $\alpha 4\beta 7$  integrina en combinación con IL-6 e IL-5, participan como importantes mediadores de la secreción de sIgA por parte de las células plasmáticas.<sup>271, 275-277</sup> Las vacunas particuladas como emulsiones, nano y micropartículas, complejos inmunoestimuladores (ISCOM), liposomas ó VLP's, se enfocan en estimular APC de manera indirecta al acceder a estas por medio de mecanismos como internalización por endosoma o de manera directa al incorporar en la partícula una molécula específica que interactúe con la DC, promoviendo su migración y maduración.<sup>199, 278</sup> Algunas características físicas de la partícula pueden ayudar en su internalización a la APC, una de estas se pueden considerar el tamaño de estas.<sup>200, 279</sup> En el caso de los VLP's, al estar en contacto con DC, inducen su maduración y la rápida secreción de citosinas inflamatorias,<sup>199, 280</sup> así como una estimulación de una respuesta humoral. Las APC al parecer presenta variaciones entre la eficiencia en el muestreo e internalización de antígenos, por lo que en el caso de las DC, internalizan con mayor facilidad partículas de un tamaño entre 20 nm y 100 nm, en el caso de macrófagos, el tamaño de partícula que se pueden fagocitar es mayor, el cual va de 200 nm hasta 2000 nm.<sup>278</sup> El contacto que se da entre los antígenos de patógenos en el tracto digestivo, respiratorio así como en el urogenital<sup>281</sup> y el sistema inmune se realiza mediante un tipo de célula

especializada, la célula M debido a su morfología microfoliada o membranosa, esta se especializa en el transporte de antígenos y su presencia se puede observar en FAE en los GALT del tracto de las aves.<sup>282</sup> La estructura de las células M es caracterizada por carecer de las microvellosidades de las demás células intestinales, presentan una invaginación profunda o compartimiento en la membrana basolateral, la cual esta ocupada por LB, LT y macrófago.<sup>281</sup> La relación que existe entre estas células y las DC es muy estrecha, ya que es posible encontrar DC justo debajo de las células M, por lo que se presentación antigénica se da directamente por debajo del domo formado por las células M y las células linfoides que las rodean.<sup>235</sup> Este muestreo es muy importante para el reconocimiento temprano de potenciales patógenos para el organismo, así como para el inicio de una respuesta inmune en los GALT.<sup>283</sup> Su localización es en los sitios de inducción, las cuales son pequeñas regiones de mucosa que se localizan por encima de los epitelios asociados a folículos (FAE) presentes en los GALT.<sup>281</sup> Debido a que los enterocitos forman uniones estrechas, se reducen las posibilidades de acceso de antígenos, sin embargo debido a que las células M se caracterizan por permitir el paso de partículas para su presentación a las DC, esta ruta es usada para la internación de antígenos además de representar una vía de entrada para algunos patógenos al organismo.<sup>234, 235, 281, 284</sup> La modulación en la captación de antígenos por parte de las células M, así como la elaboración de vacunas con afinidad para con este tipo celular, son propuestas como una estrategias para aumentar la eficiencia en la respuesta inmune mediante la administración de vacunas orales y la administración de drogas más eficientes, lo cual resulta difícil debido a las variaciones que presentan las células M entre especie, individuos o incluso entre células M de un mismo individuo.<sup>283, 285</sup> Debido a su función las células M están adaptadas para la translocación de material del lumen al interior del FAE por mecanismos como endocitosis de vesículas clatrina cubiertas, fagocitosis actina dependiente y pinocitosis o macropinocitosis, estas presentan receptores que intervienen en estos procesos tanto para partículas virales como para bacterias y algunos tipos de toxinas bacterianas.<sup>286, 287, 288</sup> Debido a que la adhesión es el primer paso para la internalización de los antígenos, la mediación de esta unión de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) con específicos patrones moleculares asociados a microbios patógenos (PAMP), además de adhesinas microbianas lectina-like capaces de unirse a glicoproteína o glicolípidos en la superficie de las células M, resultan de importancia para su paso a través de este tipo celular. La distribución y concentración de estos receptores varían entre enterocitos y células M, lo

cual explicaría también la selectividad para el paso de moléculas y patógenos entre ciertos tipos celulares.<sup>286, 288</sup> La vía de señalización de esta molécula de superficie parecen tener mucha importancia para la actividad de la célula M de relevancia para la respuesta inmune ante antígenos particulados en mucosas, sin embargo el como participa en el control de la transcitosis se desconoce.<sup>288</sup>

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente la vacunación es uno de los métodos más empleados para el control de enfermedades en la industria avícola, <sup>1, 121, 122</sup> sin embargo la alta capacidad de variación antigénica del vIA, <sup>1</sup> así como la poca protección conferida por las actuales vacunas para el control de *C. jejuni* en aves <sup>33, 35</sup> hace necesario la búsqueda de nuevos diseños de vacunas que sean prácticos en su administración, rentables y efectivos para la protección contra estos agentes patógenos, por lo que el empleo de vacunas orales expresadas en plantas resulta una opción real en el área avícola, tanto por sus ventajas de producción, <sup>192, 197, 202, 223</sup> modo de administración y resultados previos en otras especies, <sup>192, 202</sup> así como por la presencia de estructuras fisiológicas en esta especie <sup>1, 229</sup> que puedan ser vía de reconocimiento para proteínas con función de presentación antigénica, tales como los VLP's, favoreciendo la respuesta inmune.

## HIPÓTESIS

- Los VLP's HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK expresados en *N. benthamiana*, al ser administrados a pollos vía oral estimulan la producción de IgY con capacidad de reaccionar con el antígeno M2e.
- El VLP HBcAg+M2e+CJUARK administrado vía oral induce una reducción en la colonización de *C. jejuni* en tracto digestivo de las aves.

## OBJETIVOS

### General

Determinar la expresión de los VLP's HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK en *N. benthamiana* y su inmunogenicidad a la aplicación oral y subcutánea en pollo comercial.

### Particulares

- I. Insertar las secuencias codificantes para M2e+CD154 y M2e+CJUARK obtenidas previamente y proporcionadas para este experimento por parte de la Universidad de Arkansas, en el vector pHBV33 proporcionado por el CINVESTAV campus Irapuato. (Imagen 1).
- II. Determinar por medio de la técnica de ELISA de captura la expresión en *N. benthamiana* de M2e en la superficie de los VLP's: HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK.
- III. Determinar el perfil serológico por medio de la prueba de ELISA para M2e del vI a la administración oral y subcutánea del extracto de *N. benthamiana* que exprese los VLP's: HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK
- IV. Determinar el grado de colonización intestinal de *C. jejuni* en aves posterior a la administración oral y subcutánea del extracto de *N. benthamiana* que exprese VLPs: HBcAg+M2e+CJUARK.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. INSTALACIONES**

El procedimiento de transformación bacteriana y agroinfiltración se realizó en las instalaciones del CINVESTAV campus Irapuato. Se emplearon unidades de aislamiento de ambiente controlado en la Universidad de Arkansas para la realización de las pruebas en las aves de experimentación.

### **2. ANIMALES Y PLANTAS DE EXPERIMENTACIÓN**

- Se emplearon 12 plantas (*N. benthamiana*) de 21 días de edad, cultivadas bajo condiciones controladas en invernadero en instalaciones del CINVESTAV campus Irapuato.
- Se emplearon 150 pollos de raza Cobb de 1 día de edad de origen comercial.

### **3. ALIMENTO PARA LOS ANIMALES**

- Las aves consumieron alimento de origen comercial.

### **4. CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO**

El vector pHBV33 (imagen 1), proporcionado por el CINVESTAV campus Irapuato, conteniendo el gen HBc codón-optimizado para plantas bajo el control del promotor P35S, fue digerido en su sitio XbaI para después insertar las secuencias

correspondientes para M2e (E-V-E-T-P-I-R-N) + CD154 (W-M-T-T-S-Y-A-P-T-S)<sup>172, 173, 175, 203, 222, 289-294</sup> y M2e (E-V-E-T-P-I-R-N) + CJUARK (secuencia en proceso de patente por parte de la Universidad de Arkansas),<sup>172, 173, 175, 291, 295</sup> con 3 serinas (S) de separación entre las dos secuencias, resultando en los vectores pHBVM2eCD154 y pHBVM2eCJUARK.

## 5. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA Y AGROINFILTRACIÓN

Los vectores pHBVM2eCD154 y pHBVM2eCJUARK fueron introducidos en *E. coli* DH5 $\alpha$  en diferentes cultivos por electroporación,<sup>296</sup> las bacterias resultantes se cultivaron en medio LB adicionado con 50 mg/ml de kanamicina por 16 hora a 37°C para su posterior almacenamiento.<sup>292</sup> A un cultivo de la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 se le introdujo el vector pHBVM2eCD154 por electroporación, a la cual se le denominó como Clona 1-B LBA 4404. A un segundo cultivo de la cepa *A. tumefaciens* LBA4404 se le introdujo el vector pHBVM2eCJUARK por electroporación,<sup>223, 292, 296</sup> denominándosele como Clona 5-B LBA 4404. Las cepas resultantes fueron cultivadas en medios LB adicionados con 50 mg/ml de kanamicina por 48 horas a 28°C.<sup>177</sup> Se confirmó la presencia del inserto por medio de técnica de mini-preparación, reacción de digestión y migración en gel de agarosa.<sup>292</sup> Las cepas resultantes, Clona 3-B LBA 4404 y Clona 5-B LBA 4404, fueron posteriormente cultivadas en medio YENB suplementado con kanamicina (50mg/l) a 28°C por 48 horas.<sup>223</sup> El cultivo se centrifugó por 5 minutos a 4000 rpm y se ajustó la densidad óptica (OD) a 0.2 y a 0.4 OD en buffer de agroinfiltración (20 mM 2-(N-morfilino) ácido etanesulfónico (MES), a un pH de 5.5, 20 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y acetocirigona 200  $\mu$ M). La suspensión bacteriana con OD ajustada en un volumen 3 ml de buffer se mezcló previo a su aplicación a cada planta. Para lograr una expresión transitoria en *N. benthamiana*, las cepas resultantes de *A. tumefaciens* fueron usadas para la agroinfiltración de las plantas.<sup>297</sup> Las suspensiones de *A. tumefaciens* fueron inyectadas por medio de punción mediante una jeringa de 1 ml. sin aguja en plantas (*N. benthamiana*) de 21 días de edad, previamente cultivadas.<sup>223</sup>

Con el fin de obtener el mejor rendimiento en la expresión del VLP HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK, se empleó como variable la OD de las soluciones de *A. tumefaciens*, así como el tiempo en el cual se recuperaron las hojas para su posterior liofilización mediante prueba de ELISA de captura se midieron los niveles de expresión de M2e en la superficie de la proteínas HBcAg con las diferentes

formulaciones (Tabla 1). Los extractos de *N. benthamiana* con mejor rendimiento de expresión de los VLPs HBcAg+M2e+CD154 y HBcAg+M2e+CJUARK, fueron seleccionados y administrados a los grupos de experimentación.

## 6. DISEÑO DE GRUPOS

Las aves fueron distribuidas de manera aleatoria en 5 grupos de 1 día de edad hasta los 31 días de edad.

**Grupo 1:** Al día 0 del experimento a 30 aves de 1 días de edad se les administró 1 ml de PBS vía oral con un refuerzo a los 14 días de 1 ml de PBS vía oral.

**Grupo 2:** Al día 0 del experimento a 30 aves de 1 día de edad se les administró vía oral 1 ml (10mg extracto/ml) de solución del extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la muestra 4 con el VLP HBcAg+M2e+CD154, se les aplicó un refuerzo vía oral de 1 ml de la misma solución a los 14 días posteriores a la primera administración.

**Grupo 3:** Al día 0 del experimento a 30 aves de 1 día de edad se les administró vía oral 1 ml (10mg extracto/ml) de solución del extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la muestra 6 con el VLP HBcAg+M2e+CJUARK, se les aplicó un refuerzo vía oral de 1 ml de la misma solución a los 14 días posteriores a la primera administración.

**Grupo 4:** Al día 0 del experimento a 30 aves de 1 día de edad se les administro vía subcutánea 1 ml (10mg extracto/ml) de una solución del extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la muestra 4 con el VLP HBcAg+M2e+CD154, se les aplicó un refuerzo vía subcutánea 1 ml de la misma solución a los 14 días posteriores a la primera aplicación.

**Grupo 5:** Al día 0 del experimento a 30 aves de 1 día de edad se les administro vía subcutánea 1 ml (10mg extracto/ml) de una solución del extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la muestra 6 con el VLP HBcAg+M2e+CJUARK, se les aplicó un refuerzo vía subcutánea 1 ml de la misma solución a los 14 días posteriores a la primera aplicación.

Al día 21 del experimento los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 recibieron 1 ml/ ave de una solución conteniendo *C. jejuni* ( $10^8$  UFC/ml.) vía oral.

## 7 INOCULOS DE DESAFIO

- Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) preparada de acuerdo a Purchase et al.<sup>298</sup>
- Solución conteniendo *C. jejuni* a una concentración de  $10^8$  UFC/ml.

- Extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la formula 4, el material liofilizado se reconstituyo en PBS (10 mg extracto/ml)
- Extracto de *N. benthamiana* correspondiente a la formula 6, el material liofilizado se reconstituyo en PBS (10 mg extracto/ml)

## **8. TOMA DE MUESTRAS**

### **8.1 Muestras de M2e en *N. benthamiana***

Las muestras de las plantas agroinfiltradas con Clona 3-B LBA 4404 a una OD de 0.2 y 0.4 fueron muestreadas el día 2 y 3 posterior a la agroinfiltración. Las plantas agroinfiltradas con Clona 5-B LBA 4404 a una OD de 0.2 y 0.4 fueron muestreadas al día 2 y 3 posterior a la agroinfiltración. (Tabla 1)

### **8.2 Muestras serológicas para M2e y PCR tiempo real para identificación y cuantificación de *C. jejuni***

**8.2.1.** A los 21 días del experimento, se tomaron 15 aves para toma de muestras sanguíneas para la obtención de suero de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, así como también contenido intestinal de ileum para su evaluación mediante PCR tiempo real para la cuantificación de *C. jejuni*. El método de sacrificio para la obtención de estas muestras fue dislocación cervical según American Veterinary medical Association JAVMA.<sup>300</sup>

**8.2.2.** Al día 31 del experimento, se tomaron las restantes 15 aves para toma de muestras sanguíneas para la obtención de suero de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, así como también contenido intestinal de ileum para su evaluación mediante PCR tiempo real para la cuantificación de *C. jejuni*.<sup>294, 299</sup> El método de sacrificio fue dislocación cervical según American Veterinary medical Association JAVMA.<sup>300</sup>

## **9. EVALUACIÓN DE MUESTRAS**

### **9.1 Muestras de M2e en *N. benthamiana***

Las muestras de *N. benthamiana* obtenidas por agroinfiltración y liofilizadas fueron reconstituidas en buffer de ELISA en una proporción 1/10 y sometidas a la técnica de ELISA de captura para conocer los niveles de expresión de M2e en los extractos de las plantas. Se mezcló el tejido de planta en el buffer de ELISA, se mezcló y se centrifugo a 13,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue obtenido y procesado como muestra del antígeno. Se diluyó el antígeno 1 en 10 con el buffer de ELISA, se incubo en agitación a temperatura ambiente por 2 horas, para posteriormente ser incubado toda la noche a

4°C. Transcurrido el lapso de incubación, se procedió a 3 lavados rápidos con PBS a 0.05% tween 20 (PBS-T), para 2 posteriores lavados de 5 minutos con PBS-T. Se incubó por 1 hora con superbloc (200 µl/pozos). Se incubó la placa con el 1° anticuerpo (IgG policlonales anti-M2e) diluidos 1:25 en PBS + 2% de suero fetal bovino, 100 µl / pozos por 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados rápidos con PBS-T y 2 lavados de 5 minutos con PBS-T, para después agregar 100 µl/pozo del 2° anticuerpo (IgY aviar marcado con peroxidasa) y se incubó por 1 hora, para después repetir el procedimiento de lavado además de un lavado de 5 minutos (100 µl/pozo) con buffer acetato. Se adicionó el sustrato (100 µl/pozo), y se agregó la solución stop 25 µl 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se procedió a la lectura. Como control positivo se empleó una muestra de M2e sintético a una concentración de 500 µg/ml (Universidad de Arkansas).

## **9.2 Muestras serológicas para determinación de IgY en suero contra M2e y muestras de contenido intestinal para la prueba de PCR tiempo real para identificación y cuantificación de *C. jejuni***

**9.2.1.** Las muestras de suero obtenidas el día 21 y 31 del experimento de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron sometidas a la prueba de ELISA, la prueba se realizó de acuerdo a Layton SL, *et al.* <sup>291</sup>

**9.2.2.** Las muestras de contenido intestinal de ileum correspondientes al día 21 y 31 del experimento de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron sometidas a la prueba de PCR tiempo real, la prueba se realizó de acuerdo a Skånseng B *et al.* 2006, <sup>299</sup> validando la técnica con un elevado índice de repetitividad y un bajo índice de inhibición <sup>294, 299</sup>

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las diferencias entre tratamientos en la colonización de *C. jejuni* medida en Log<sub>10</sub> y la presencia específica de IgY en suero contra M2e, fueron sometidas a estudio de análisis de varianza utilizando el procedimiento de GENERAL LINEAR MODELS (GLM) <sup>301</sup>. La diferencia mínima se consideró con una diferencia significativa de (P < 0.05) <sup>301</sup> Las diferencias significativas fueron separadas usando Duncans multiple range test y el software comercial de análisis estadístico (SAS institute, 2002) SAS Institute Inc., 2002.

302

## RESULTADOS

### **1. Muestras de VLP HBcAg+M2e+CD154 y VLP HBcAg+M2e+CJUARK en *N. benthamiana***

#### **1.1. Expresión de VLP HBcAg+M2e+CD154 en *N. benthamiana*.**

La muestra 4 obtuvo un valor en la relación S/P de 1.70 en la prueba de ELISA de captura para la determinación de M2e, siendo este un valor superior observado entre las muestras 1 con una relación S/P de 1.39, muestra 2 con una relación S/P de 1.54 y la muestra 3 con una relación S/P de 1.51, así como en comparación con la muestra control positivo que presentó una relación S/P de 0.69.

Se determinó mediante la relación entre el testigo positivo y cada muestra la concentración aproximada de M2e, observando un aproximado de M2e de 8137.681 µg/ml en la muestra 4, en la muestra 2 con 7579.71 µg/ml, en la muestra 3 con 7442.029 µg/ml y en la muestra 1 con 7018.11 µg/ml, por lo que se consideró a la muestra 4 para su empleo en las pruebas en los animales de experimentación. (Figura 1)

#### **1.2 Expresión de VLP HBcAg+M2e+CJUARK en *N. benthamiana*.**

La muestra 6 obtuvo en la evaluación con la prueba de ELISA para la determinación de M2e, un valor en la relación S/P de 1.15, este valor resultó ser el mayor en comparación con las muestras 5 con una relación S/P de 1.01, muestra 7 con una relación S/P de 0.93 y muestra 8 con una relación S/P de 0.91, de igual forma su valor fue incluso superior a lo obtenido en la muestra control positivo con un valor en la relación S/P de 0.69.

Al realizar el cálculo aproximado en la expresión de M2e en relación al testigo positivo se observó un valor aproximado de 6108.69 µg/ml en la muestra 6, en la muestra 5 con 5583.333 µg/ml, la muestra 7 con 5293.478 µg/ml y en la muestra 8 con 5217.391 µg/ml; por lo que se consideró a la muestra 6 para su empleo en las pruebas en los animales de experimentación. (Figura 2)

### **2. Muestras serológicas para determinación de IgY en suero contra M2e y muestras de contenido intestinal para la prueba de PCR tiempo real para identificación y cuantificación de *C. jejuni*.**

#### **2.1. Evaluación de IgY en suero contra M2e mediante la prueba de ELISA.**

**2.1.1.** En la evaluación de sueros de las aves mediante la prueba de ELISA, se observó un aumento a los 21 días iniciado el experimento en la presencia de IgY en las aves en los grupos 2, 3, 4 y 5 con un valor en el rango S/P de  $0.048 \pm 0.008$ ,  $0.047 \pm 0.008$ ,

$0.047 \pm 0.008$  y  $0.055 \pm 0.01$  respectivamente en comparación con las aves del grupo 1 con un valor en el rango S/P de  $0.01 \pm 0.01$ .

Se determinó la existencia de diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los valores de la relación S/P de los grupos 2, 3, 4 y 5 en comparación con el grupo 1. (Figura 3)

**2.1.2.** Lo observado en el segundo muestreo a los 31 días, muestra un patrón de comportamiento distinto, ya que a la evaluación de IgY en suero mediante la prueba de ELISA se observó un aumento en la presencia de IgY en suero con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo 4 con un valor en la relación S/P de  $0.15 \pm 0.01$  y el grupo 5 con un valor en la relación S/P de  $0.18 \pm 0.05$  en comparación con el grupo 1 con un valor en la relación S/P de  $0.035 \pm 0.007$ .

Por otro lado se observa un aumento en la presencia de IgY en suero en el grupo 2 con un valor en el rango S/P de  $0.11 \pm 0.02$  y el grupo 3 con un valor en el rango S/P de  $0.11 \pm 0.01$  sin embargo este aumento no mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con comparación con el valor del rango S/P del grupo 1, ni tampoco mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con relación al aumento en los valores del rango S/P de los grupos 4 y 5.

El grupo 1 se mantuvo con niveles de IgY por debajo de los demás grupos de experimentación, sin embargo estos solo muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con relación a solo los grupos 4 y 5. (Figura 3)

## **2.2. Identificación y cuantificación de *C. jejuni* en contenido intestinal mediante la prueba de PCR tiempo real.**

**2.2.1.** En muestreo en el día 21 antes del reto con *C. jejuni*, se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la presencia de *C. jejuni* entre el grupo 2 con una colonización de  $1.73 \pm 0.04 \text{ Log}^{10}$  y el grupo 5 con una colonización de  $2.05 \pm 0.09 \text{ Log}^{10}$ .

No existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la presencia de *C. jejuni* entre los grupos 1 con una colonización de  $1.79 \pm 0.08 \text{ Log}^{10}$ , el grupo 3 con una colonización de  $1.90 \pm 0.12 \text{ Log}^{10}$  y el grupo 4 con una colonización de  $1.80 \pm 0.07 \text{ Log}^{10}$  en comparación con la presencia de *C. jejuni* en tracto digestivo del grupo 2 y el grupo 5. (Figura 4)

**2.2.2.** Posterior al reto con *C. jejuni* a los 31 días, se observa que el grupo 3 muestra una disminución en la presencia de *C. jejuni* con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al presentar una colonización de  $2.86 \pm 0.46$  en comparación con la presencia de *C. jejuni*

en el grupo 1 con una colonización de  $7.46 \pm 0.06$ , el grupo 2 con una colonización de  $7.76 \pm 0.15$ , así como el grupo 4 con una colonización de  $7.50 \pm 0.07$ . Esta reducción en la presencia de *C. jejuni* en tracto digestivo se observó también en el grupo 5 con una colonización de  $4.62 \pm 0.66$  con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la colonización de *C. jejuni* en los grupos 1, 2 y 4.

La reducción en la presencia de *C. jejuni* en el grupo 3 y el grupo 5, resultó mayor en el caso del grupo 3, existiendo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambas reducciones en la colonización intestinal de *C. jejuni*. (Figura 4)

## DISCUSIÓN

Los resultados en la medición de M2e por medio de la prueba de ELISA de captura demuestran la presencia de este epítipo en la superficie de los VLP's HBcAg+M2e+CD154 y VLP HBcAg+M2e+CJUARK, lo que concuerda con previos trabajos donde se demuestra la capacidad del VLP HBcAg de expresar en su superficie el epítipo M2e del vI.<sup>172, 173, 176, 177, 178, 226</sup>

Su determinación por medio de la prueba de ELISA demostró el correcto ensamblaje de la estructura viral del VLP HBcAg ya que se sabe que en la presencia de secuencias de aa's que no favorezcan su armado ya sea por su secuencia, tamaño e interacciones entre específicos residuos de aa's, el VLP HBcAg resulta en degradación y no es posible encontrar este capsómero como producto final ni la medición de epítopos específicos en su superficie.<sup>203, 204, 222</sup>

Estudios previos demuestran que la expresión de VLP HBcAg en diversos bioreactores,<sup>176, 192, 202, 221</sup> en este caso, plantas<sup>202</sup> se logra mediante la técnica de agroinfiltración con *A. tumefaciens*, y el empleo de vectores binarios,<sup>192, 202, 219, 220, 221</sup> alcanzando niveles de expresión del VLP HBcAg desde  $10 \mu\text{g/g}$  hasta  $50 \mu\text{g/g}$  de hoja liofilizada,<sup>192</sup> por lo que si bien en este experimento no fue medida la presencia específica del VLP HBcAg, fue posible la medición de la expresión del epítipo M2e en la superficie del VLP HBcAg por medio de ELISA de captura.

La expresión combinada de epítopos como el M2e+CD154 así como M2e+CJUARK en la superficie del VLP HBcAg no interfirió con la expresión del VLP HBcAg, ya que si bien se sabe que la expresión de secuencias no mayores a 45 aa's es posible en este VLP quimera,<sup>203, 204, 222</sup> así como la expresión del epítipo M2e de vI en el VLP HBcAg,<sup>173, 176, 177, 178, 223, 226</sup> este es el primer reporte de la expresión del epítipo M2e en

combinación con los epítomos CD154 y el CJUARK de *C. jejuni* en la superficie del VLP HBcAg, resultando en la medición de la expresión M2e por medio de Ig.

Respecto a la evaluación de los títulos de IgY contra M2e en suero a los 21 días iniciado el experimento fue posible observar un aumento en todos los grupos de experimentación en comparación con el grupo 1, ya que el VLP HBcAg al poseer características que favorecen su presentación por parte de las DC a los LT,<sup>192, 200, 202, 222, 224, 226</sup> hizo posible que en ambas rutas tanto oral como subcutánea se diera el estímulo para la producción de IgY, corroborando su expresión en *N. benthamiana* y determinando su antigenicidad en las aves inoculadas.

La participación del tejido linfoide característico de mucosas digestivas,<sup>197, 198</sup> así como el propio de aves,<sup>229</sup> en el caso de la aplicación oral del VLP HBcAg pudo favorecer la identificación del antígeno y procesamiento del epítomo M2e por parte de las DC<sup>278, 279</sup> y su presentación a LT,<sup>224</sup> así como la estimulación de LB<sup>226</sup> para iniciar la respuesta humoral presente en estos grupos.

Las características de resistencia de los VLP's como el HBcAg,<sup>192, 227</sup> aunado a su expresión en el tejido de la planta,<sup>192, 193, 197, 198, 218</sup> protegió de la digestión en su aplicación oral al VLP HBcAg lo suficiente para ser reconocido y presentado al sistema inmune, montado una respuesta humoral contra M2e, lo cual se reporta en diversos tipos de VLP's, expresados en diversos modelos biológicos.<sup>197</sup>

En la evaluación a los 31 días iniciado el experimento, el aumento en los títulos de IgY contra M2e, en los grupos que recibieron el HBcAg expresando en su superficie el epítomo M2e en combinación con los epítomos CD154 y CJUARK por vía subcutánea mostraron un aumento en los títulos de IgY en comparación con lo observado en el grupo1, lo cual concuerda con lo reportado en trabajos previos donde se demuestra que a la aplicación vía parenteral<sup>223, 224</sup> del VLP HBcAg logra un efecto de estimulación en la producción de anticuerpos específicos, aun en dosis muy reducidas.<sup>224</sup>

Ante esta respuesta resulta de interés el sitio de inserción de los epítomos M2e, CD154 y CJUARK el cual corresponde a lo reportado como el mejor para inducir una respuesta específica contra las secuencias insertadas y menor contra los epítomos propios del VLP HBcAg,<sup>222</sup> permitiendo su correcta expresión en la superficie; así como trabajos en donde el VLP HBcAg resulta efectivo para la transportación del epítomo M2e.<sup>173, 176, 177, 178, 223, 226</sup>

Cabe mencionar que lo observado en la vía oral, en el caso de la medición de IgY en suero contra M2e a los 31 días iniciado el experimento demostró que esta ruta resulta

más difícil para la estimulación de IgY sistémicas, a diferencia de lo reportado en mamíferos,<sup>223</sup> ya que si bien se observó un aumento en los títulos este aumento no es estadísticamente significativo tanto en comparación con la vía subcutánea como con los títulos del grupo 1, sin embargo esto no resulta contundente para la determinación de su efectividad como vacuna, ya que se sabe que la vía de aplicación y sitio de estimulación inmunológica es determinante tanto para la producción de inmunidad sistémica como para la inmunidad humoral en mucosas.<sup>231, 239,-242</sup>

Por lo que si bien la producción de IgY resulta poco significativa, es necesaria la evaluación de sIgA en mucosas contra M2e<sup>223</sup> bajo las mismas condiciones de experimentación, lo cual podría representar un dato interesante para medir el potencial de protección de este tipo de vacunas, así como ante retos virales.<sup>172, 174, 175, 291</sup>

Trabajos previos demuestran la participación en la respuesta inmune del CD154,<sup>248, 249, 251, 256</sup> tanto en mamíferos como en aves,<sup>251, 257</sup> siendo favorable para una respuesta inmune a la vacunación,<sup>251, 259, 290, 291, 294</sup> sin embargo a la evaluación de IgY en suero a los 21 días y a la evaluación a los 31 días de iniciado el experimento, tanto los grupos que no recibieron el epítipo correspondiente al CD154 y los que si lo recibieron en combinación con el epítipo M2e, no presentaron diferencia entre ellos.

Lo antes descrito puede ser atribuido la incorrecta expresión del epítipo CD154 en comparación con el epítipo M2e,<sup>203, 204, 205, 222</sup> así como a la poca efectividad de la secuencia empleada en este caso. Si bien la secuencia CD154 había sido probada con anterioridad,<sup>251, 290, 291, 294</sup> esta no había sido utilizada en combinación con el epítipo M2e en la superficie del VLP HBcAg, por lo que la secuencia de aa's empleada no resultó en esta evaluación determinante para la obtención de un aumento en la inducción de IgY en suero a los 21 y 31 días de iniciada la prueba.

Debido a que en el presente experimento no se realizó reto contra vIA de LP y HP, no es posible la determinación de la capacidad de conferir protección contra retos bajo condiciones de campo y laboratorio con vIA, por lo que se requiere de una evaluación similar a la realizada con otros vectores<sup>135, 139, 141, 142, 143, 146, 148, 155, 158, 159</sup> para la comparación de este modelo vacunal en relación a otros tipos de vacunas contra vIA incluyendo la expresión de VLP's del vI en plantas<sup>164, 165</sup>

Previo al reto con *C. jejuni* se determinó la presencia de este microorganismo en las aves de los grupos de experimentación,<sup>294, 299</sup> lo cual indicó ciertas diferencias entre dos grupos previo al reto, sin embargo los resultados en la colonización de *C. jejuni* en intestino demuestran que no existió diferencia estadística entre los grupos que

recibieron el VLP HBcAg con las combinaciones de epítomos M2e+CD154 y M2e+CJUARK vía oral o subcutánea en comparación con el grupo que recibió solo PBS. Se sabe que la presencia de *C. jejuni* en aves es común<sup>20-25</sup> ya que se encuentra distribuida ampliamente en el ambiente,<sup>3, 4, 5</sup> en diversas especies<sup>7, 8, 9, 13, 14, 16</sup> y su elevada capacidad de colonización del tracto digestivo de las aves,<sup>17, 20, 24</sup> por lo que su presencia en estos grupos resultó consistente con lo reportado previamente.

Otros factores a considerar en esta primera evaluación además de la administración del VLP HBcAg expresando el epítomo de *C. jejuni* CJUARK, es la inmunidad materna en las primeras 2 semanas de edad del pollo contra *C. jejuni*,<sup>26</sup> así como la producción de sIgA por parte del ave en presencia de *C. jejuni*, ya que en ambos casos, estas variantes son capaces de modificar la capacidad de colonización de *C. jejuni*.<sup>33, 34</sup>

Las Ig presentes en las aves serían lo suficientemente efectivas para mantener la población de *C. jejuni* similar en todos los grupos aun en los no vacunados, dado que estas aves tienen un origen comercial,<sup>20-23</sup> evitando que se reflejará el efecto a la administración del VLP HBcAg con el epítomo CJUARK tanto por vía oral como por vía parenteral con respecto a la valoración de la colonización en tracto digestivo de las aves a los 21 días del experimento previo al reto con *C. jejuni*.

Después del reto con *C. jejuni* se observaron diferencias entre los grupos de experimentación, esta evaluación se realizó en las aves después de la disminución de la inmunidad materna que se sabe va en disminución a partir de la 2º semana de edad del ave comercial,<sup>26</sup> por lo que el reto a *C. jejuni* puede ser considerado como independiente de los títulos con los que las aves llegaron al experimento.

Se observó a los 10 días posteriores al reto con *C. jejuni* la colonización en las aves que recibieron el VLP HBcAg que expresan M2e y CD154 por ambas vías, presentando una elevada colonización de *C. jejuni* en tracto digestivo,<sup>17, 22, 23, 24</sup> así como el grupo que recibió solo PBS, a diferencia de las aves que fueron tratadas con el VLP HBcAg+M2e+CJUARK las cuales presentan una reducción, por lo que la presencia del epítomo CJUARK en la superficie fue inmunológicamente efectivo para inducir una respuesta inmune,<sup>33, 34</sup> debido a las características de los PAL<sup>44, 45, 46, 47, 48, 50, 51</sup> entre las que se encuentra la Omp18,<sup>2, 3, 48, 49, 53</sup> así como el tipo de respuesta observada a la aplicación oral del VLP HBcAg con epítomos específicos,<sup>223</sup> el cual en este caso logra producir una reducción en la colonización en tracto digestivo.<sup>33, 34</sup>

Lo observado en su evaluación concuerda con trabajos previos con este epítomo aplicado en aves.<sup>291, 295</sup> Aunado a esto, existió una diferencia significativa entre las dos vías de

aplicación, oral y subcutánea del VLP HBcAg+M2e+CJUARK, ya que si bien ambos casos reducen la capacidad de colonización de *C. jejuni*, su aplicación vía oral resulta más efectiva para la reducción en su colonización en tracto digestivo del ave, esto debido a que el sitio de estimulación antigénica es determinante para el tipo de respuesta inmune.<sup>231, 238, 240, 241, 242</sup>

Se sabe que la administración de antígenos vía oral, en muchos casos no resulta en una respuesta inmune protectora o incluso en una tolerancia al antígeno,<sup>235, 236, 237, 238</sup> siendo la estimulación de células M,<sup>235, 282, 283</sup> DC,<sup>261, 269</sup> LT y LB esencial para la inducción de una respuesta inmune, por lo que el empleo de partículas transportadoras como los VLP's, favorecen esta ruta de estimulación por encima de solo epitopos solubles,<sup>172, 193</sup> siendo el VLP HBcAg un VLP quimera con capacidad de presentación de epitopos,<sup>193</sup> aunado a su expresión en plantas, favoreciendo su aplicación oral directamente en el tejido vegetal.<sup>193, 202</sup> Es importante considerar la correcta vía de reconocimiento e internación de estos antígenos,<sup>283, 285</sup> siendo los VLP's una opción para la vacunación al servir como una plataforma para epitopos de agentes patógenos expresados en su superficie como vacunas.<sup>192, 193</sup>

## CONCLUSIONES

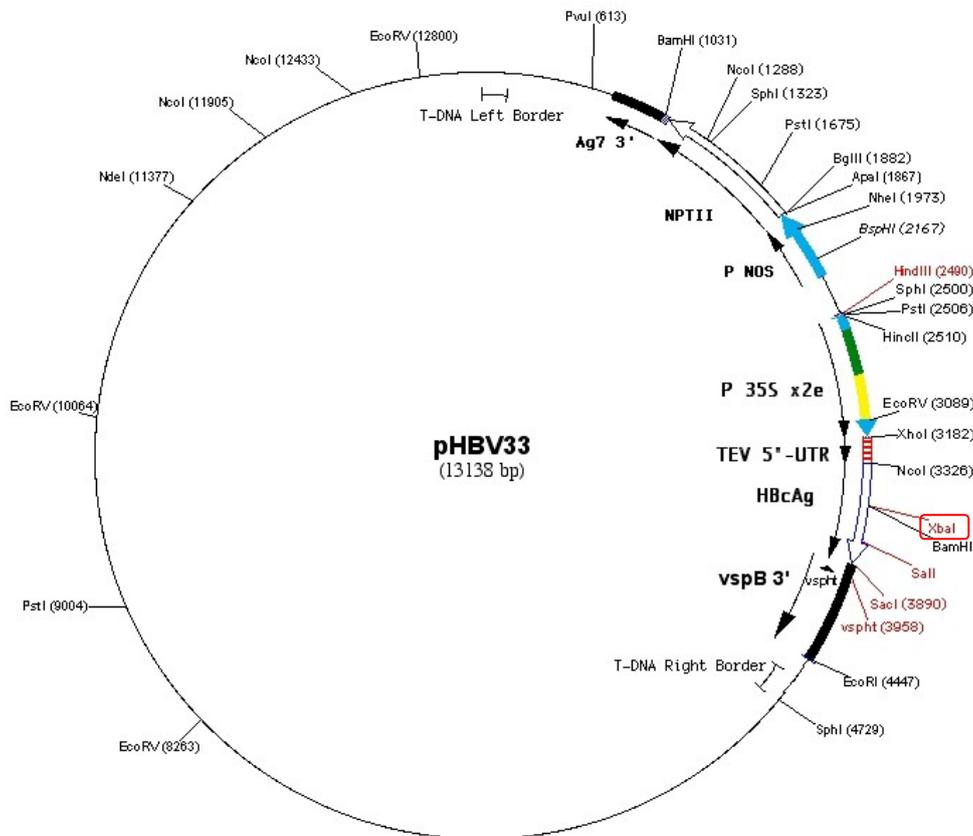
- La expresión del VLP HBcAg+M2e+CD154 y el VLP HBcAg+M2e+CJUARK se logra en tejido de plantas *N. benthamiana* mediante el empleo de la técnica de agroinfiltración con *A. tumefaciens*.
- Los epítomos M2e y CJUARK son antígenicamente funcionales al ser expresados en la superficie del VLP HBcAg en hojas de *N. benthamiana*.
- El epítomo CD154 expresado en combinación con M2e en la superficie del VLP HBcAg en hojas de *N. benthamiana*, a las dosis manejadas no resulta en una mayor estimulación en la producción de IgY en suero de las aves.
- La vía de administración del VLP HBcAg expresado en *N. benthamiana* es determinante para el tipo de respuesta inmune en aves.
- Los tejidos linfoides en tracto digestivo de las aves son capaces de reconocer y presentar el VLP HBcAg al sistema inmune al ser administrado en tejido vegetal sin procesar.

## ANEXOS

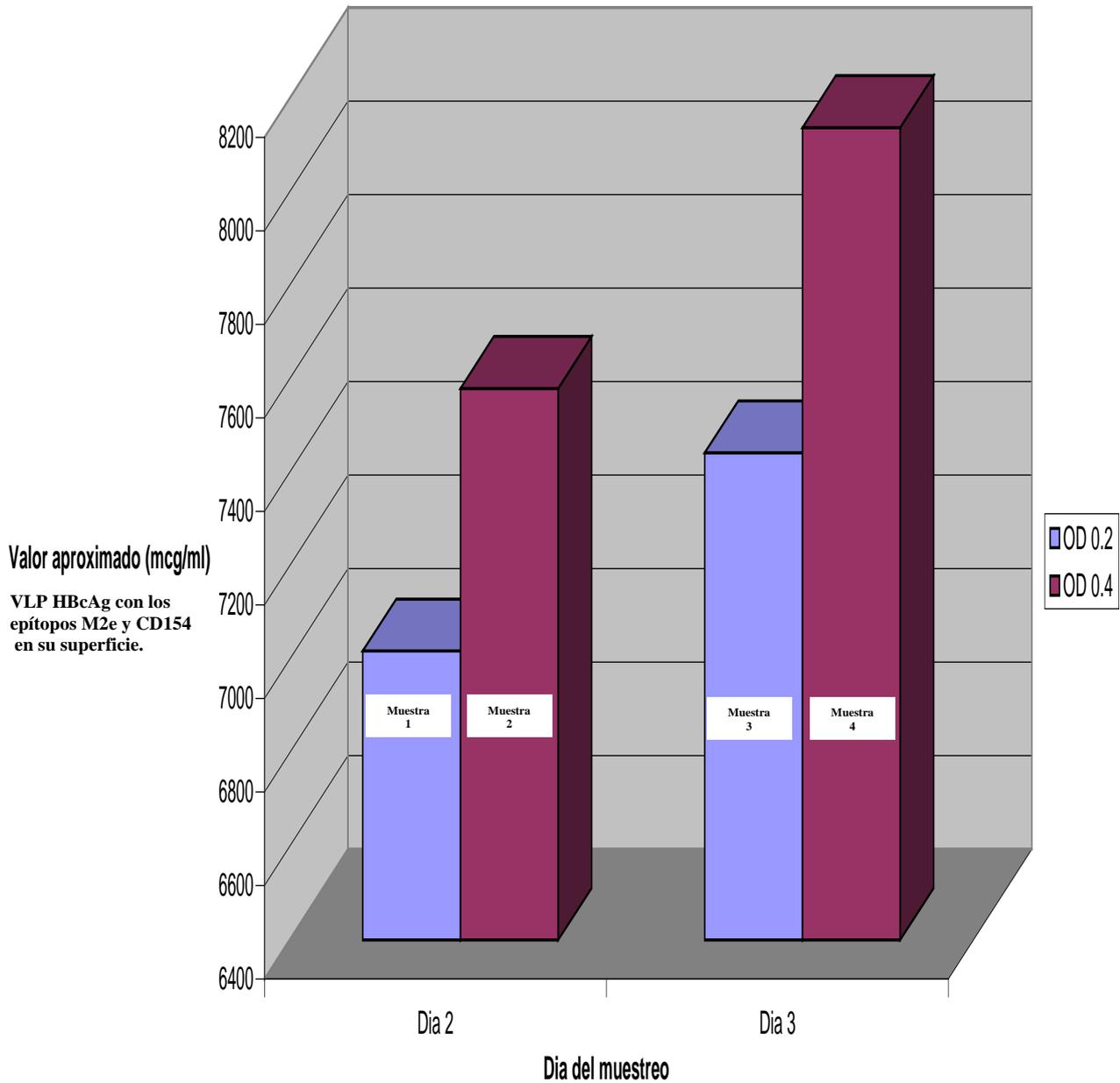
**Tabla 1. Identificación de muestras de *N. benthamiana* agroinfiltradas con Clona 3-B LBA 4404 y Clona 5-B LBA 4404.**

Identificación de muestra	Densidad óptica (OD) del inóculo aplicado en hojas	Clona presente en inóculo	Día de muestreo de las hojas
1	0.2	Clona 3-B LBA 4404	2
2	0.4	Clona 3-B LBA 4404	2
3	0.2	Clona 3-B LBA 4404	3
4	0.4	Clona 3-B LBA 4404	3
5	0.2	Clona 5-B LBA 4404	2
6	0.4	Clona 5-B LBA 4404	2
7	0.2	Clona 5-B LBA 4404	3
8	0.4	Clona 5-B LBA 4404	3

**Imagen 1. Mapa del vector pHBV33.**



**Figura 1. Expresión del VLP HBcAg+M2e+CD154 en *N. benthamiana*.**

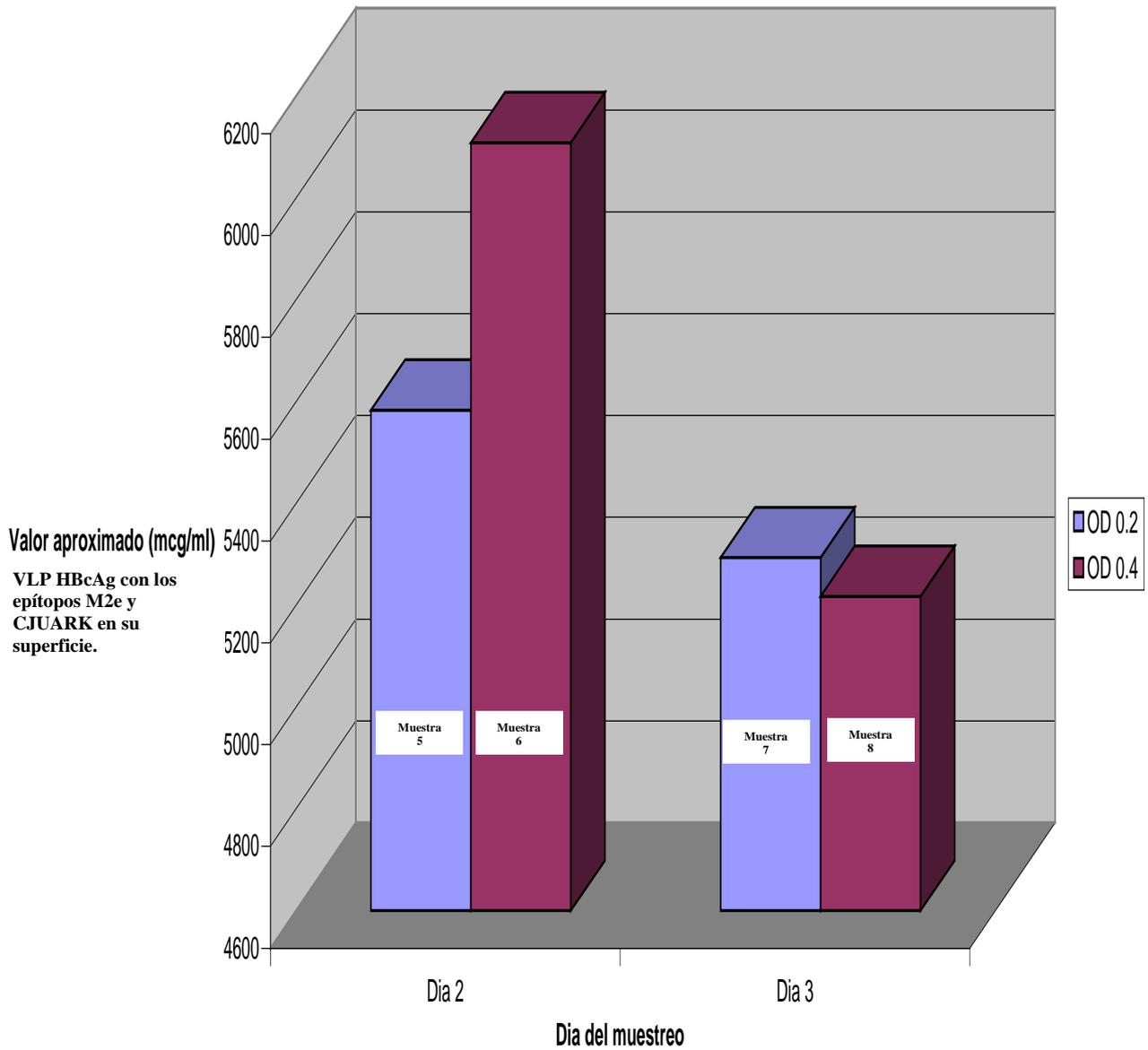


Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
7018.11*	7579.71*	7442.029*	8137.681*

(\*Volumen en  $\mu\text{g/ml}$  de M2e )

Figura 1. Cada muestra en este caso contenía exclusivamente **VLP HBcAg+M2e+CD154 en *N. benthamiana***. La muestra 4 obtuvo un valor en la relación S/P de 1.70 en la prueba de ELISA de captura para la determinación de M2e, siendo este un valor superior con relación al resto de las muestras, resultando con un aproximado de M2e de 8137.681  $\mu\text{g/ml}$  en la muestra 4, siendo esta seleccionada para las pruebas en animales.

**Figura 2. Expresión del VLP HBcAg+M2e+CJUARK en *N. benthamiana*.**

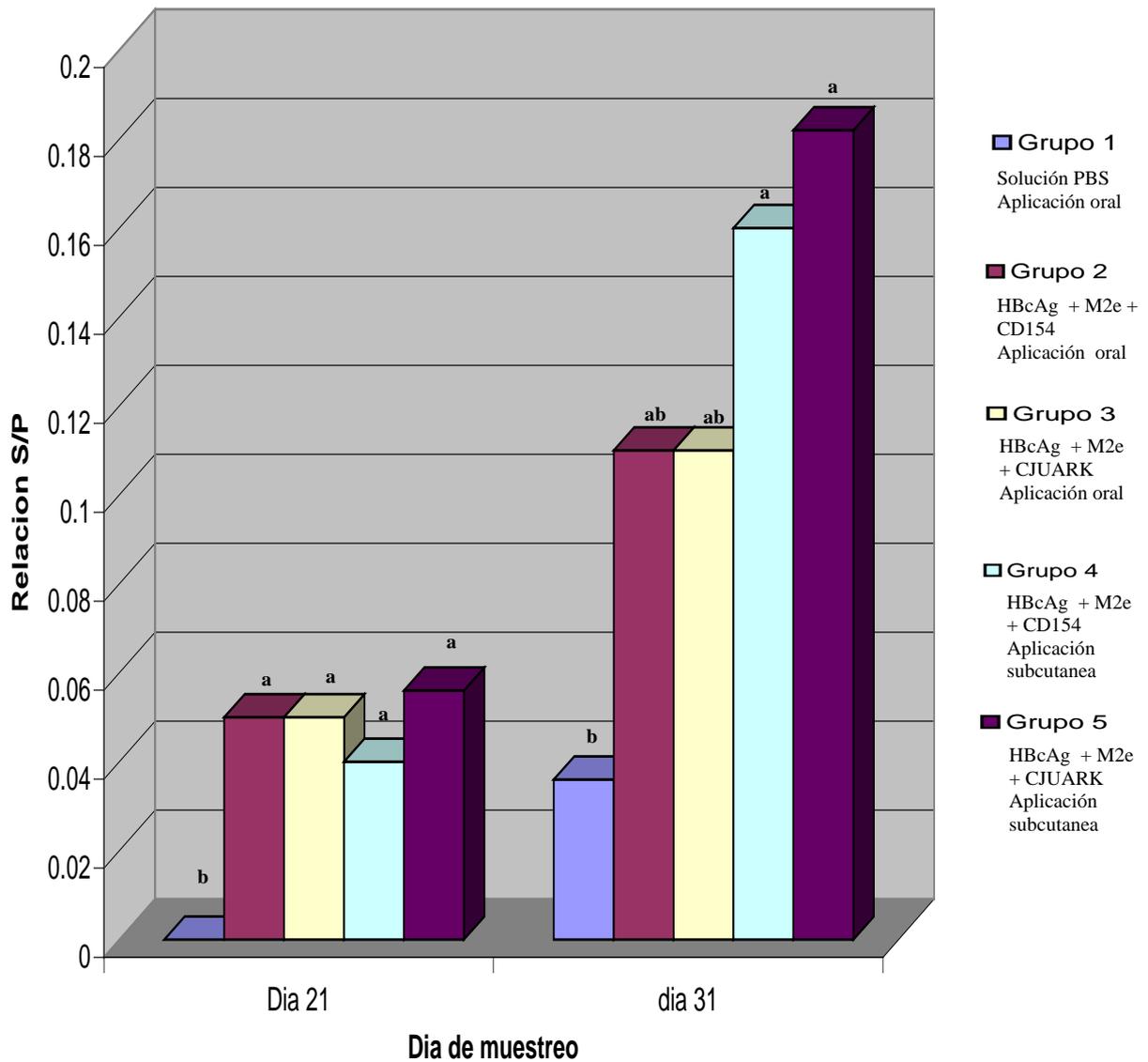


Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8
5583.333*	6108.696*	5293.478*	5217.391*

(\*Volumen en  $\mu\text{g/ml}$  de M2e )

Figura 2. Cada muestra en este caso contenía exclusivamente **VLP HBcAg+M2e+CJUARK en *N. benthamiana***. La muestra 6 obtuvo un valor en la relación S/P de 1.15 en la prueba de ELISA de captura para la determinación de M2e, siendo este un valor superior con relación resto de las muestras, resultando con un aproximado de M2e de 6,108.69  $\mu\text{g/ml}$  en la muestra 6, siendo esta seleccionada para las pruebas en animales.

**Figura 3. Evaluación de IgY en suero mediante la prueba de ELISA.**

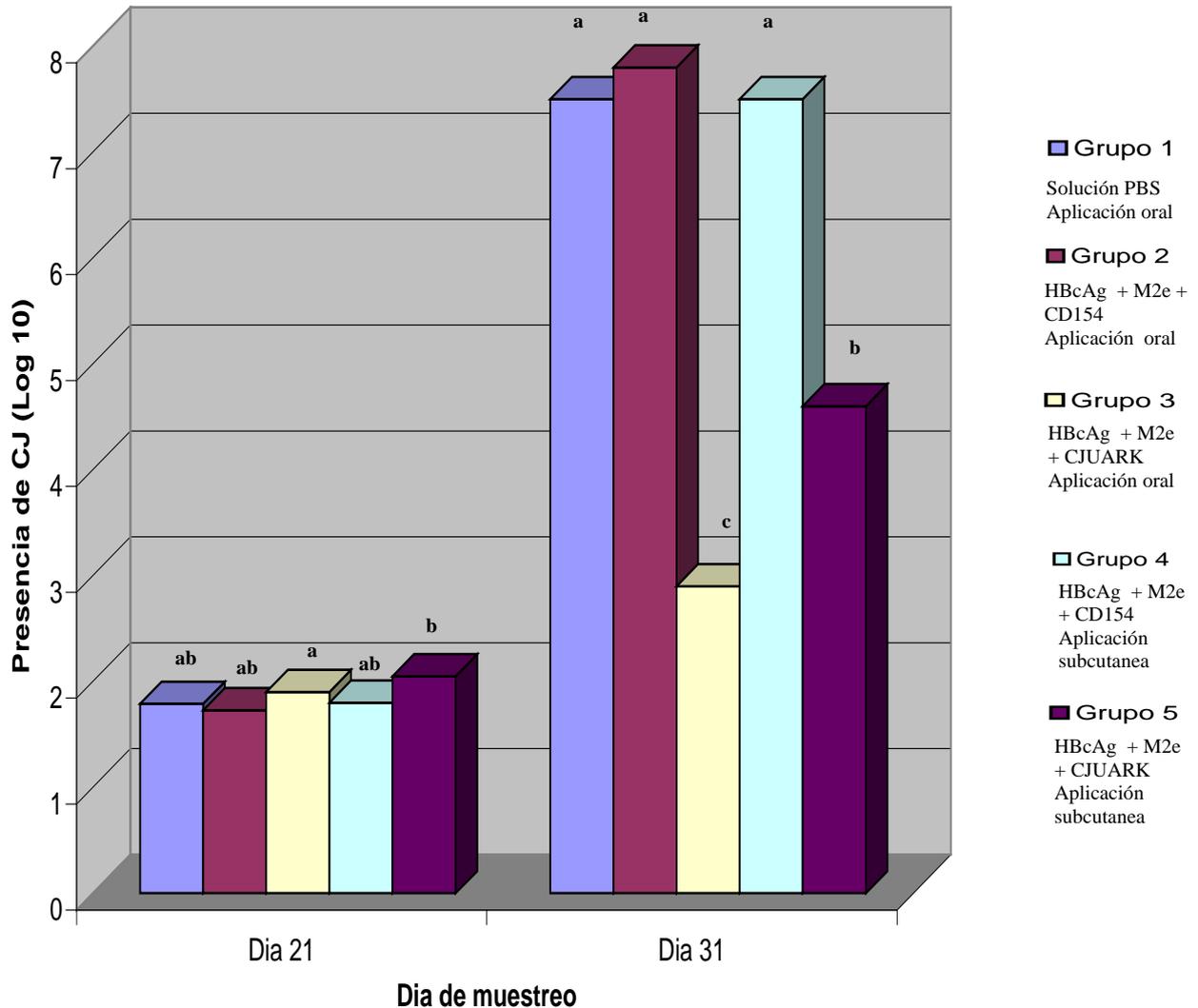


Grupos	S/P Relación S/P a los 21 días (media ± S <sup>1</sup> )	Relación S/P a los 31 días (media ± S <sup>1</sup> )
Grupo 1	0.01 ± 0.01 b	0.035 ± 0.007 b
Grupo 2	0.048 ± 0.008 a	0.11 ± 0.02 ab
Grupo 3	0.047 ± 0.008 a	0.11 ± 0.01 ab
Grupo 4	0.047 ± 0.008 a	0.15 ± 0.01 a
Grupo 5	0.055 ± 0.01 a	0.18 ± 0.05 a

Figura 3. En la evaluación de sueros se observa un aumento a los 21 días en la presencia de IgY en las aves en los grupos 2, 3, 4 y 5 en comparación con las aves del grupo 1 con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos. Se observa al día 32 un aumento en la presencia de IgY en suero en el grupo 4 y grupo 5, con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo 1. Por otro lado se observa un aumento en la presencia de IgY en suero en el grupo 2 y el grupo 3 sin una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con comparación con el valor del los grupos 1, 4 y 5.

- ❖ <sup>1</sup> Media ± Desviación Estándar.
- ❖ Literales distintas señalan diferencia significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

**Figura 4. Colonización de *C. jejuni* mediante la prueba de PCR tiempo real.**



Grupos	Colonización de <i>C. jejuni</i> antes del reto día 21 (Log10) (media $\pm$ S <sup>1</sup> )	Colonización de <i>C. jejuni</i> después del reto día 31 (Log10) (media $\pm$ S <sup>1</sup> )
Grupo 1	1.79 $\pm$ 0.08 ab	7.46 $\pm$ 0.06 a
Grupo 2	1.73 $\pm$ 0.04 b	7.76 $\pm$ 0.15 a
Grupo 3	1.90 $\pm$ 0.12 ab	2.86 $\pm$ 0.46 c
Grupo 4	1.80 $\pm$ 0.07 ab	7.50 $\pm$ 0.07 a
Grupo 5	2.05 $\pm$ 0.09 a	4.62 $\pm$ 0.66 b

Figura 4. En muestreo en el día 21 antes del reto con *C. jejuni*, se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la presencia de *C. jejuni* entre el grupo 2 y el grupo 5. No existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la presencia de *C. jejuni* entre los grupos 1, 3 y 4 en comparación con el grupo 2 y el grupo 5. A los 31 días se observa el grupo 3 con una disminución en la presencia de *C. jejuni* con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con los grupos 1, 2 y 4. El grupo 5 presenta reducción en con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con la colonización de *C. jejuni* en los grupos 1, 2 y 4. La reducción en la presencia de *C. jejuni* en el grupo 3 y el grupo 5, resultó mayor en el caso del grupo 3, existiendo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambas reducciones. Validación de acuerdo a Skånseng B *et al.* 2006.<sup>299</sup>

- ❖ <sup>1</sup> Media  $\pm$  Desviación Estándar.
- ❖ Literales distintas señalan diferencia significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

## REFERENCIAS

1. Saif Y. M., Banes H.J., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Swayne D.E. 2003. Diseases of poultry CD 11th edition, Iowa state press, Blackwell publishing company.
2. Konkel ME, Mead DJ, Cieplak WJR. Cloning, Sequencing, and Expression of a Gene from *Campylobacter jejuni* Encoding a Protein (Omp18) with Similarity to Peptidoglycan-Associated Lipoproteins. *Infect Immun* 1996; 64:1850-1853.
3. Penner JL. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 157-172.
4. Sebald, M., and M. VWron. 1963. Teneuren bases de L'ADN et classification de vibrions. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 1963; 105:897-910.
5. Karmali MA, Fleming PC. *Campylobacter enteritis* in children. *J. Pediatr* 1979; 94:527-533.
6. Neill SD, Campbell JN, O'Brien JJ, Weatherup ST, Ellis WA. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophilia* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1985; 35:342-356
7. Moore Je, Corcoran D, Dooley Jsg, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, Mcdowell Da, Mégraud F, Millar Bc, O'mahony R, O'riordan L, O'rourke M, Rao Jr, Rooney Pj, Sails A, Whyte P. *Campylobacter*. *Vet. Res* 2005; 36:351-382.
8. Moore JE, Matsuda M, The history of *Campylobacter*: taxonomy and nomenclature, *Irish Vet. J.* 2002; 10:495-501
9. Tauxe RV, Emerging foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol* 2002; 78:31-41.
10. Penner JL, Hennessy JN, Congi RV. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol* 1983; 2:378-383.
11. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human *Campylobacter* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 237- 243.
12. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:555-567
13. Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Vila J, Gascon J. Trends in antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. causing traveler's diarrhea. *APMIS* 2007; 115:218-224.

14. Gallardo F, Gascón J, Ruiz J, Corachan M, Jimenez de Anta M, Vila J. *Campylobacter jejuni* as a cause of traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial susceptibility. *J Travel Med* 1998; 5:23-26.
15. Taylor DE, Eaton M, Yan W, Chang N. Genome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Bacteriol* 1992; 174:2332-2337.
16. Stern NJ, Hernandez MP, Blankenship LC, Deibel KE, Doores S, Doyle MP, Ng H, Pierson MD, Sofos JN, Sveum WH, Westhoff DC. Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail meats. *J Food Prot* 1985; 48:595-599
17. Conlan AJK, Coward C, Grant AJ, Duncan, Gog DJM, Gog JR. *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. *J. R. Soc. Interface* 2007; 4:819-829
18. Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in Northeastern Italy. *Int. J. Food Microbiol* 2003; 82:281-287
19. Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C, Rodas-Suárez OR, Ramos-Flores MO, Rodríguez-Montaña R. Frequency of isolation of *Campylobacter* from roasted chicken samples from Mexico City. *J Food Prot.* 2000; 63:117-119.
20. Beery J, Hugdahl M, Doyle M. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol* 1988; 54:2365-2370.
21. Shane SM. *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Rev sci tech* 2000; 19:376-395
22. Cawthraw SA, Wassenaar TM, Ayling R, Newell DG. Increased colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks. *Epidemiol Infect* 1996; 117:213-215.
23. Dhillon AS, Shivaprasad HL, Schaberg D, Wier F, Weber S, Bandli D. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. *Avian Dis* 2006; 50:55-58.
24. Stern NJ, Meinersmann RJ, Cox NA, Bailey JS, Blankenship LC. Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis* 1990; 34:602-606.
25. Cox NA, Richardson LJ, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ, Bailey JS, Wilson JL, Hiett KL. Natural presence of *Campylobacter spp* in various internal organs of commercial broiler breeder hens. *Avian Dis* 2006; 50:450-453.

26. Sahin O, Luo N, Huang S, Zhang Q. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol* 2003; 69: 5372-5379.
27. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1092-1099.
28. Blaser MJ, Allos BM, Lang D. Development of Guillain-Barré Syndrome following *Campylobacter* infection. *J Infect Dis* 1997; 176: 91-200.
29. Baar I, Jacobs BC, Govers N, Jorens PG, Parizel PM, Cras P. *Campylobacter jejuni*-induced acute transverse myelitis. *Spiral Cord* 2007; 45:690-694
30. Allos BM. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis* 1997;176:125-128
31. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. 5th Edition. W.H. Freeman and Co 1995.
32. Perera VN, Nachamkin I, Ung H, Patterson JH, McConville MJ, Coloe PJ, Fry BN. Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni*: role of the lipo-oligosaccharide core oligosaccharide in inducing anti-ganglioside antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50:27-36.
33. Widdersa PR, Thomas LM, Long KA, Tokhi MA, Panaccio M, Apos E. The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology* 1998; 64:39-50.
34. Myszewski MA, Stern NJ. Influence of *Campylobacter jejuni* cecal colonization on immunoglobulin response in chickens. *Avian Dis* 1990; 34: 588-594.
35. Rice BE, Rollins DM, Mallinson ET, Carr L, Joseph SW. *Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. *Vaccine* 1997; 15: 1922-1932.
36. Solis de los Santos F, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Reyes-Herrera I, Metcalf JH, Dirain ML, Aguiar VF, Blore PJ, DonoghueDJ. Therapeutic Supplementation of Caprylic Acid in Feed Reduces *Campylobacter jejuni* Colonization in Broiler Chicks. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74: 4564-4566.
37. Solis de los Santos F, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Dirain ML, Reyes-Herrera I, Blore PJ, Donoghue DJ. Caprylic Acid Supplemented in Feed Reduces Enteric *Campylobacter jejuni* Colonization in Ten-Day-Old Broiler Chickens. *Poult Sci* 2008; 87:800-804.

38. Farmacología veterinaria sumano. Ocampo L, Suman H, segunda edition, 1997.  
Editorial Mc graw hill
39. Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Sea BS. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of Its Bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3111-3116.
40. Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP. *Paenibacillus polymyxa* purified bacteriocin to control *Campylobacter jejuni* in chickens. *J Food Prot* 2005; 68:1450-1453.
41. Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70:564-582.
42. Oppegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;13:210-219.
43. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6554-6563.
44. Stucki U, Frey J, Nicolet J, Burnens AP. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J Clin Microbiol* 1995; 33:855-859.
45. Pei ZH, Blaser MJ. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gramnegative nutrient transport systems. *J Biol Chem* 1993; 268:18717-18725.
46. Pei ZH, Ellison RT, Blaser MJ. Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 1991; 266: 16363-16369.
47. Nachamkin I, Bohachick K, Patton CM. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1531-1536.
48. Burnens A, Stucki U, Nicolet J, Frey J. Identification and Characterization of an Immunogenic Outer Membrane Protein of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2826-2832.

49. Yamaguchi K, Yu F, Inouye M. A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 1988; 53:423-432.
50. Murphy TF, Bartos LC, Rice PA, Nelson MB, Dudas KC, Apicella MA. Identification of a 16,600-Dalton Outer Membrane Protein on Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a Target for Human Serum Bactericidal Antibody. *J Clin Invest* 1986; 78:1020-1027.
51. Demaria TF, DM. Murwin DM, Leake ER. Immunization with Outer Membrane Protein P6 from Nontypeable *Haemophilus influenzae* Induces Bactericidal Antibody and Affords Protection in the Chinchilla Model of Otitis Media. *Infection and immunity*. 1996; 64: 5187–5192.
52. Sabirov A, Kodama S, Hirano T, Suzuki M, Mogi G. Intranasal Immunization Enhances Clearance of Nontypeable *Haemophilus influenzae* and Reduces Stimulation of Tumor Necrosis Factor Alpha Production in the Murine Model of Otitis Media. *Infection and immunity*. 2001; 69: 2964–2971.
53. Rokosz N, Rastawicki W, Jagielski M. Evaluation of usefulness of commercial recomwell *Campylobacter* enzyme linked immunosorbent assays for routine serodiagnosis of *campylobacter jejuni* and *coli* infections. *Med Dosw Mikrobiol*. 2008; 60: 289-295.
54. Stubbs EL. *Fowl Pest*. *J Am Vet Med Assoc*. 1926; 21: 561-569.
55. Spackman E. *Methods in molecular biology* 436, Avian influenza virus, 2007
56. World Organization for Animal Health, Chapter 2.7.12, Avian Influenza in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, (2005) [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00037.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm)
57. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech*. 2000; 19: 463-482
58. Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol*. 2000; 29: 537-543
59. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: Amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis*. 1996; 40: 425-437.
60. WHO Expert Committee. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: A WHO memorandum. *Bull WHO*. 1980: 585-591.

61. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 2000; 74: 3-13.
62. Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, in *Fields Virology*, 4th ed. 2001, (Knipe DM Howley PM, eds.). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, pp. 1487-1532.
63. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.* 1995; 140:1163-1172.
64. Stallknecht DE, Shane SM, Zwank PJ, Senne DA, Kearney MT. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana. *Avian Dis.* 1990; 34: 398-405.
65. Pedersen JC. Neuraminidase-inhibition assay for the identification of influenza A virus neuraminidase subtype or neuraminidase antibody specificity *Methods Mol Biol.* 2008; 436:67-75.
66. Swayne DE, Senne DA, Beard CW. 1998. Influenza. In Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM. eds. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, 150-155.
67. Austin FJ, Webster RG. Antigenic mapping of an avian H1 influenza virus haemagglutinin and interrelationships of H1 viruses from humans, pigs and birds. *J Gen Virol.* 1986; 67: 983-992.
68. Hinshaw VS, Alexander DJ, Aymand M, Bachmann PA, Easterday BC, Hannoun C, Kida H, Lipkind M, Mackenzie JS, Nerome K, Schild CG, Scholtissek C, Senne DA, Shortridge KF, Skehel JJ, Webster RG. Antigenic comparisons of swine-influenza-like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: an international collaborative study. *Bull WHO.* 1984; 62: 871-878.
69. Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE. H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys. *J. Virol.* 2006; 80: 7760-7764.
70. Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee C, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak in Chile. *Emerging Infect. Dis.* 2004;10: 693-699.

71. Cox NJ, Fuller F, Kaverin N, Klenk HD, Lamb RA, Mahy BW, McCauley JW, Nakamura K, Palese P, Webster RG. Orthomyxoviridae. In Regenmortel Van MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds.). *Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses.* Academic Press: San Diego, 2000: 585-597.
72. Franklin RM, Wecker E. Inactivation of some animal viruses by hydroxylamine and the structure of ribonucleic acid. *Nature.* 1959; 84: 343-345.
73. Laver G. The structure of influenza viruses. II. Disruption of the virus particles and separation of neuraminidase activity. *Virol.* 1963; 20: 251-262.
74. King DJ. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Dis.* 1991; 35: 505-514.
75. Pleschka S, Jaskunas SR, Engelhardt OG, Zurcher T, Palese P, García AA. A Plasmid-Based Reverse Genetics System for Influenza A Virus *J Virol.* 1996; 70: 4188-4192.
76. Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, Nakanishi Y, Fukuda R. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J of Gen Virol.* 1993; 74: 232-235.
77. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-sissoko N, Evans D. Apoptosis: a Mechanism of Cell Killing by Influenza A and B Viruses *J Virol.* 1994; 68:3667-3673.
78. Fujimoto I, Takizawa T, Ohba Y, Nakanishi Y. Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells. *Cell Death and Differentiation.* 1998; 5:426-431.
79. Suarez DL, Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza A Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong. *J Virol.* 1998; 72: 6678-6688.
80. Swayne DE, Slemons RD. Renal pathology in specific-pathogen-free chickens inoculated with a waterfowl-origin type A influenza virus. *Avian Dis.* 1990; 34: 285-294.
81. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. *Science.* 1998; 16:393-396.

82. Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LEL, Senne DA, Lee J, Lee Y, Mo I, Sung H, Swayne DE. Characterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat, *J Virol.* 2002; 76: 6344-6355.
83. Mori I, Kimura Y. Apoptotic neurodegeneration induced by influenza A virus infection in the mouse brain. *Microbes and Infection.* 2000; 2: 1329-1334.
84. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. *J Gen Virol.* 1995; 76: 2869-2873.
85. Fernandez PA, Rotello RJ, Rangini Z, Doupe A, Drexler HCA, Yuan JY. Expression of a specific marker of avian programmed cell death in both apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8641-8645.
86. Schultz-Cherry S, Hinshaw VS. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol.* 1996; 70: 8624-8629.
87. Takizawa T, Fukuda R, Miyawaki T, Ohashi K, Nakanishi Y. Activation of the apoptotic fast antigenencoding gene upon influenza virus infection involving spontaneously produced beta-interferon. *Virology.* 1995; 209: 288-296.
88. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can. J. Microbiol.* 1980; 26: 622-629.
89. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. Water-borne transmission of influenza A viruses. *Intervirology.* 1979; 11: 66-69.
90. Slemons RD, Easterday BC. Type-A influenza viruses in the feces of migratory waterfowl. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1977; 171: 947-948.
91. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WR, Murti KG. Intestinalinfluenza; replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 1978; 84: 268-278.
92. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol.* 2000; 74: 11825-11831.
93. Ito T, Suzuki Y, Suzuki T, Takada A, Horimoto T, Wells K, Kida H, Otsuki K, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Recognition of N Glycolylneuraminic Acid Linked to Galactose by the  $\alpha 2$  3 Linkage Is Associated with Intestinal Replication of Influenza A Virus in Ducks *J Virol.* 2000; 74: 9300-9305.
94. Amino Acid Residues Contributing to the Substrate Specificity of the Influenza A Virus Neuraminidase Kobasa D, Kodihalli S, Luo M, Castrucci MR, Donatelli I, Suzuki Y, Suzuki T, Kawaoka Y. *J Virol.* 1999; 73: 6743-6751.

95. Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet. Microbiol.* 1992; 33: 303-310.
96. Wu X, Hui KM. Induction of Potent TRAIL-Mediated Tumoricidal Activity by hFLEX/Furin/TRAIL Recombinant DNA Construct Xiaofeng Wu and Kam M. Hui. *Mol Ther.* 2004; 9: 674-681.
97. Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology.* 1979; 95: 197-207.
98. Grober S, Vey AM, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 1992; 11: 2407-2414.
99. Nakayama K. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J.* 1997; 327: 625-635.
100. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz MVZE, Perdue ML. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol.* 1996; 77: 1493-1504.
101. Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. *Virology* 1995; 213: 223-230.
102. Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* 1997; 49: 173-186.
103. Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol.* 2000; 74: 77-86.
104. Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: The pivotal role of hemagglutinin. *Cell.* 1987; 50: 665-666 .
105. Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J Virol.* 1984; 51: 567-569.

106. Suarez DL, Perdue ML. Multiple alignment comparison of the non-structural genes of influenza A viruses. *Virus Res.* 1998; 54: 59-69.
107. Zohari S, Gyarmati P, Ejdersund A, Berglöf U, Thorén P, Ehrenberg M, Czifra G, Belák S, Waldenström J, Olsen B, Berg M.. Phylogenetic analysis of the non structural NS gene of influenza A viruses isolated from mallards in Northern Europe in 2005. *Virology.* 2008; 12: 135:147.
108. Ludwig S, Schultz U, Mandler J, Fitch WM, Scholtissek C. Phylogenetic relationship of the nonstructural (NS) genes of influenza A viruses *Virology.* 1991; 183: 566-577.
109. Guo, Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology.* 1992; 188: 245-255.
110. Kiss I, Gyarmati P, Zohari S, Ramsay KW, Metreveli G, Weiss E, Brytting M, Stivers M, Lindström S, Lundkvist A, Nemirov K, Thorén P, Berg M, Czifra G, Belák S. Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in Sweden in 2006. *Virology.* 2008; 6;5:113
111. Bragstad K, Jørgensen PH, Handberg K, Hammer AS, Kabell S, Fomsgaard A. First introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses in wild and domestic birds in Denmark, Northern Europe. *Virology.* 2007; 11: 4:43
112. Swayne DE, Pathobiology of H5N2 Mexican Avian Influenza Virus Infections of Chickens. *Vet Pathol* 1997; 34: 557-567.
113. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol.* 1991; 119: 37-42.
114. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12:3-8.
115. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 152-179.
116. Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol.* 2000; 74: 15-27.
117. Morgan IR Westbury HA. Virological studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian Dis.* 1981; 25: 1019-1026.

118. Austin FJ, Webster RG. Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctic. *J Wildl Dis.* 1993. 29:568-571
119. Situacion Zoosanitaria En Los Estados De La Republica Mexicana Fuente: CPA, Dirección de Campañas Zoosanitarias, Dirección de Vigilancia Epidemiológica y Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana
120. Latorre-Margalef N, Gunnarsson G, Munster VJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Elmberg J, Olsen B, Wallensten A, Haemig PD, Fransson T, Brudin L, Waldenström J. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks., *Proc Biol Sci.* 2009; 22:1029-1036.
121. 08-14-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.
122. 11-17-98 Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995. Campaña nacional contra la Influenza Aviar.
123. sistema de produccion animal volumen II, Division sistema universidad abierta y educacion a distancia, 2005. UNAM.
124. McNulty MS, Allan GM, Adair BM. Efficacy of avian influenza neuraminidase-specific vaccines in chickens. *Avian Pathol.* 1986; 15: 107-115.
125. Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. 1991; 9: 303-308.
126. Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA—what have we learned?. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 2635–2662.
127. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *PNAS.* 2000; 97: 6108–6113.
128. Yang H, Carney P, Stevens J. Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. *PLoS Curr Influenza.* 2010; 22:RRN1152.
129. Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Müllerer CW, Ruigrok RWH, Florence Baudin F. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO Journal.* 2003; 22: 4646-4655.

130. Govorkova EA, Webby RJ, Humberd J, S  ller JP, Webster RG. Immunization with reverse-genetics-produced H5N1 influenza vaccine protects ferrets against homologous and heterologous challenge. *J. Infect. Dis.* 2006; 194:159–167.
131. Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H. Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1- inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology.* 2005; 341:153–162.
132. Guoa CT, Takahashi T, Bukawa W, Takahashi N, Yagi H, Kato K, Jwa Hidari KIP, Miyamoto D, Suzuki T, Suzuki Y. Edible bird’s nest extract inhibits influenza virus infection. *Antiviral Research.* 2006; 70:140–146.
133. Rajik M, Omar AR, Ideris A Hassan SS, Yusoff K. A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells. *Int. J. Biol. Sci.* 2009; 5:543-548.
134. Jeon SH, Kayhan B, Ben-Yedidia T, Arnon R. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin *J Biol Chem.* 2004; 279: 48410-48409.
135. Jeon SH, Arnon R. Immunization with Influenza Virus Hemagglutinin Globular Region Containing the Receptor-Binding Pocket. *Viral Immunology.* 2002; 15: 165-176.
136. Xie QM, Ji J, Du LQ, Cao YC, Wei L, Xue CY, Qin JP, Ma JY, Bi YZ. Preparation and immune activity analysis of H5N1 subtype avian influenza virus recombinant protein-based vaccine. *Poult Sci.* 2009; 88:1608-1615.
137. Song L, Nakaar V, Kavita U, Price A, Huleatt J, Tang J, Jacobs A, Liu G, Huang Y, Desai P, Maksymiuk G, Takahashi V, Umlauf S, Reiserova L, Bell R, Li H, Zhang Y, McDonald WF, Powell TJ, Tussey L. Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PLoS One.* 2008; 21; e2257.
138. Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate. Shoji Y, Chichester JA, Bi H, Musiychuk K, Rosa P, Goldschmidt L, Horsey A, Ugulava N, Palmer GA, Mett V, Yusibov V. *Vaccine;* 2008; 26: 2930-2934.
139. Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine.* 2003; 21: 4532-4538.

140. Kodihall S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG. Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol* 1997; 71: 2291-3396.
141. Fuchs W, Veits J, Mettenleiter TC. Recombinant viruses of poultry as vector vaccines against fowl plague. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2006; 119: 160-166.
142. Prel A, Gall-Reculé G, Cherbonnel M, Grasland B, Amelot M, Jestin V. Assessment of the Protection Afforded by Triple Baculovirus Recombinant Coexpressing H5, N3, M1 Proteins Against a Homologous H5N3 Low-Pathogenicity Avian Influenza Virus Challenge in Muscovy Ducks. *Avian diseases.* 2007; 51: 484-489.
143. Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, Tumpey TM, King DJ, Nakaya T, Palese P, García-Sastre A. Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Dis.* 2003; 47:1047-1050.
144. Ge J, Deng G, Wen Z, Tian G, Wang Y, Shi J, Wang X, Li Y, Hu S, Jiang Y, Yang C, Yu K, Bu Z, Chen H. Newcastle Disease Virus-Based Live Attenuated Vaccine Completely Protects Chickens and Mice from Lethal Challenge of Homologous and Heterologous H5N1 Avian Influenza Viruses. *J Virol.* 2007; 81: 150-158.
145. Nakaya T, Cros J, Park MS, Nakaya Y, Zheng H, Sagrera A, Villar E, García-Sastre A, Palese P. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol;* 2001; 75:11868-11873.
146. Gao W, Soloff AC, Lu X, Montecalvo A, Nguyen DC, Matsuoka Y, Robbins PD, Swayne DE, Donis RO, Katz JM, Barratt-Boyes SM, Gambotto A. Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J. Virol.* 2006; 80: 1959–1964.
147. Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, Belser JA, Lu X, Stephenson I, Bright RA, Katz JM, Mittal SK, Sambhara S. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* 2006; 367: 475-481.
148. Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens

- immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*; 2000; 18: 1088-1095.
149. Qiao C, Yu K, Jiang Y, Li C, Tian G, Wang X, Chen H. Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006; 124: 127-132.
  150. Bublot M, Pritchard N, Cruz JS, Mickle TR, Selleck P, Swayne DE. Efficacy of a Fowlpox-Vectored Avian Influenza H5 Vaccine Against Asian H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Challenge. *Avian diseases*. 2007; 51:498-500.
  151. Bublot M, Pritchard N, Swayne DE, Selleck P, Karaca K, Suarez DL, Audonnet JC, Mickle TR. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1081: 193-201.
  152. Qiao CL, Yu KZ, Jiang YP, Jia YQ, Tian GB, Liu M, Deng GH, Wang XR, Meng QW, Tang XY. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol*. 2003; 32: 25-32.
  153. Lan D, Shi X, Wang Y, Liu C, Wang M, Cui H, Tian G, Li J, Tong G. Construction of a recombinant HVT virus expressing the HA gene of avian influenza virus H5N1 via Rde/ET recombination system. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2009; 49: 78-84.
  154. Kalhoro NH, Veits J, Rautenschlein S, Zimmer G. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1). *Vaccine*. 2009; 27: 1174-1183.
  155. Pavlova SP, Veits J, Keil GM, Mettenleiter TC, Fuchs W. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine*. 2009; 27: 773-785.
  156. Veits J, Lüscho D, Kindermann K, Werner O, Teifke JP, Mettenleiter TC, Fuchs W. Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. *J General Virology*. 2003; 84: 3343-3352.

157. Karaca K, Dubovi EJ, Siger L, Robles A, Audonnet JC, Jiansheng Y, Nordgren R, Minke JM. Evaluation of the ability of canarypox-vectored equine influenza virus vaccines to induce humoral immune responses against canine influenza viruses in dogs. *Am J Vet Res.* 2007; 68: 208-212
158. Song H, Ramirez-Nieto G, and Perez DR. A New Generation of Modified Live-Attenuated Avian Influenza Viruses Using a Two-Strategy Combination as Potential Vaccine Candidates. *J Virol.* 2007; 81: 9238-9248.
159. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, Perez DR, García-Sastre A, Palese P. Live Attenuated Influenza Viruses Containing NS1 Truncations as Vaccine Candidates against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza. *J. Virol.* 2009; 83: 1742-1753.
160. Quan FS, Vunnavu A, Compans RW, Kang SM. Virus-like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic influenza virus in mice. *PLoS One.* 2010;5: e9161.
161. Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res.* 2009; 143: 140-146.
162. Tao P, Luo M, Zhu D, Qu S, Yang Z, Gao M, Guo D, Pan Z. Virus-like particle vaccine comprised of the HA, NA, and M1 proteins of an avian isolated H5N1 influenza virus induces protective immunity against homologous and heterologous strains in mice. *Viral Immunol.* 2009;22: 273-281.
163. Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrillov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G, Ross TM. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine.* 2007; 25: 3871-3878.
164. D'Aoust MA, Couture MM, Charland N, Trépanier S, Landry N, Ors F, Vézina LP. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J.* 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
165. D'Aoust MA, Lavoie PO, Couture MM, Trépanier S, Guay JM, Dargis M, Mongrand S, Landry N, Ward BJ, Vézina LP. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnol J.* 2008; 6: 930-940.

166. Arnon R, Ben-Yedidia T. Preclinical efficacy of a virus-like particle-based vaccine against avian influenza H5N1. *Future microbial*. 2009; 4: 503-505.
167. Römer-Oberdörfer A, Veits J, Helferich D, Mettenleiter TC. *Vaccine*. 2008; 26: 2307-2313. Level of protection of chickens against highly pathogenic H5 avian influenza virus with Newcastle disease virus based live attenuated vector vaccine depends on homology of H5 sequence between vaccine and challenge virus.
168. Kalhor NH, Veits J, Rautenschlein S, Zimmer G. *Vaccine*. 2009; 27: 1174-1183. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1).
169. Construction of Influenza Virus siRNA Expression Vectors and Their Inhibitory Effects on Multiplication of Influenza Virus. Li YC, Kong LH, Cheng BZ, Li KS. *Avian diseases*. 2005; 49: 562-573.
170. Tang LH, Pan ZM, Cheng NN, Jiao XA, Zhang XM. Construction and immunogenicity of attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring stable DNA vaccine against H5 subtype of avian influenza virus. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2007 Aug;47(4):662-6.
171. Worrall EE, Sudarismanb, Priadi A. Sialivac: An intranasal homologous inactivated split virus vaccine containing bacterial sialidase for the control of avian influenza in poultry. *Vaccine*. 2009; 27: 4161-4168
172. Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature medicine*. 1999; 10: 1157-1163.
173. De Filette M, Martens W, Roose K, Deroo T, Vervalle F, Bentahir M, Vandekerckhove J, Fiers W, Saelens X. An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *J Biol Chem*. 2008; 283: 11382-11387.
174. Tompkins SM, Zhao ZS, Lo CY, Misplon JA, Liu T, Ye Z, Hogan RJ, Benton KA, Tumpey TM, Epstein SL. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 426-435.
175. Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, Tang J, McDonald W, Song L, Evans RK, Umlauf S, tussey L, Powell TJ. Potent

- immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*. 2008; 26: 201-214.
176. De Filette MA, Ramneb A, Birkett A, Lycke N, Löwenadler Min Jou BW, Saelens X, Fiers W. The universal influenza vaccine M2e-HBc administered intranasally in combination with the adjuvant CTA1-DD provides complete protection. *Vaccine*. 2006; 24: 544–551.
  177. Fiers W, De Filette M, Birkett A, Neiryneck S, Min Jou W. A "universal" human influenza A vaccine *Virus Res*. 2004; 103: 173-176.
  178. De Filette M, Fiers W, Martens W, Birkett A, Ramne A, Löwenadler B, Lycke N, Jou WM, Saelens X. Improved design and intranasal delivery of an M2e based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 2006; 24: 6597-601.
  179. Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J Virol*. 2002; 76: 1391-1399.
  180. Watanabe T, Watanabe S, Ito H, Kida H, Kawaoka Y. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J Virol*. 2001; 75: 5656-5662.
  181. Pinto LH, Lamb RA. The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses. *J Biological Chemistry*. 2006; 281: 8997-9000.
  182. Ma C, Soto CS, Ohigashi Y, Taylor A, Bournas V, Glawe B, Udo MK, DeGrado WF, Lamb RA, Pinto LH. Identification of the Pore-lining Residues of the BM2 Ion Channel Protein of Influenza B Virus. *J Bio Chem*. 2008; 283: 15921-15931.
  183. Zou P, Liu W, Wu F, Chen YH. Fine-epitope mapping of an antibody that binds the ectodomain of influenza matrix protein 2 EVETPIRN. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008; 53:79-84.
  184. Liu W, Zou P, Chen YH. Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge. *Immunology Letters*. 2004; 93: 131-136.
  185. Zou P, Liu W, Chen YH. The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5: 631-635.

186. Liu W, Li H, Chen YH. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;20: 141-146.
187. Liu W, Zou P, Ding J, Lu Y, Chen YH. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes and Infection.* 2005; 7: 171-177.
188. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 3389-3402.
189. Jegerlehner A, Schmitz N, Storni T, Bachmann MF. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2 weak protection mediated via antibody dependent NK cell activity. *J Immunol.* 2004; 172: 5598-5605.
190. Heinen PP, Rijsewijk FA, Boer-Luijze EA, Bianchi ATJ. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2–nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J of Gen Virol.* 2002; 83: 1851-1859.
191. Lamb RA, Zebedee SL, Richardson CD. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell.* 1985; 40: 627-633.
192. Santi L, huang Z, Mason h. Virus-like particles production in green plants. *Methods.* 2006; 40: 66-76.
193. Grgaci EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 2006; 40: 60-65.
194. Clarke BE, Newton SE, Carroll AR, Francis MJ, Appleyard G, Syred AD, Highfield PE, Rowlands DJ, Brown F. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature.* 1987; 330: 381-384
195. Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J virol.* 1992; 66: 6527-6532
196. Wang KC, Wu JC, Chung YC, Ho YC, Chang MD, Hu YC. Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 89: 464-473.

197. Streatfield SJ, Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines, *Methods*. 2006; 38: 150-157
198. Walmsley AM, Arntzen C. Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current opinion in biotechnology*. 2003; 14:145-150.
199. Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells *Clin Immunol*. 2003; 3: 231-237.
200. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 2004; 173: 3148-3154.
201. Fiers W, Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Jou WM. Soluble recombinant influenza vaccines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;29:1961-1963.
202. Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. Virus-like particles expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*. 2005; 23: 1851-1858.
203. Schödel F, Peterson D, Hughes J, Wirtz R, Milich D. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes. *J Biotechnol*. 1996; 44: 91-96.
204. Koletzki D, Zankl A, Gerderblom HR, Meisel h, Dislers A, Borisova G, Pumpens P, Krüger DH, Ulrich R. Mosaic hepatitis B virus core particles allow insertion of extended foreign protein segments. *J Gen Virol*. 1997; 78: 2049-2053.
205. Shödel F, Peterson D, Milich D. Hepatitis B virus core and antigen: immune recognition and use as vaccine carrier moiety. *Intervirology*. 1996; 39: 104-110.
206. Ball JM, Hardy ME, Atmar RL, Conner ME, Estes MK. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J. Virol*. 1998; 72: 1345-1353.
207. Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin. Immunol*. 2003; 108: 241-247.

208. Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk Virus-like Particles Given Orally to Volunteers: Phase I Study, *Gastroenterology*. 1999; 117: 40-48.
209. Kimchi-Sarfaty C, Arora M, Sandalon Z, Oppenheim A, Gottesman MM. High cloning capacity of in vitro packaged SV40 vectors with no SV40 virus sequences. *Human Gene Therapy*. 2003; 14: 167-177.
210. Frazer IH, Quinn M, Nicklin JL, Tan J, Perrin LC, Ng P, O'Connor VM, White O, Wendt N, Martin J, Crowley JM, Edwards SJ, McKenzie AW, Mitchell SV, Maher DW, Pearse MJ, Bassler RL. Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 2004; 23: 172-181.
211. Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, Hevey M, Schmaljohn C, Schmaljohn A, Aman MJ. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp. Med*. 2002; 593-602.
212. Wilschut J. Influenza vaccines: The virosome concept. *Immunol Lett*. 2009; 21:118-121.
213. Bungener L, Huckriede A, Mare A, Vries-Idema J, Wilschut J, Daemen T. Virosome-mediated delivery of protein antigens in vivo: efficient induction of class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte activity. *Vaccine*. 2005; 23: 1232-1241.
214. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 9305-9310.
215. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol*. 2004; 172: 1777-1785.
216. Chu RS, McCool T, Greenspan NS, Schreiber JR, Harding CV. CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants for Pneumococcal Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines and Enhance Antipolysaccharide Immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 Antibodies. *Infection and immunity*. 2000; 68: 1450-1456.

217. Vajdy M, Lycke N. Stimulation of antigen-specific T- and B-cell memory in local as well as systemic lymphoid tissues following oral immunization with cholera toxin adjuvant. *Immunology*. 1993; 80: 197-203.
218. Thanavala Y, Huang Z, Mason HS. Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev Vacc*. 2006; 5: 249-260.
219. Valentine L. *Agrobacterium tumefaciens* and the Plant: The David and Goliath of Modern Genetics. *Plant Physiology* 2003; 133: 948–955.
220. Clifton NJ. *Methods in molecular biology*. Binary vectors and super-binary vectors 2006, 343: 15-41.
221. JBillaud JN, Peterson D, Schödel F, Chen A, Sallberg M, Garduno F, Goldstein P, McDowell W, Hughes J, Jones J, Milich D. Comparative Antigenicity and Immunogenicity of Hepadnavirus Core Proteins *J Virol*. 2005; 79: 13641-13655.
222. Schödel F, Moriarty AM, Peterson D, Zheng J, Hughes JL, Will H, Leturcq DJ, McGee JS, Milich DR. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis b virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol*. 1992; 66:106-114.
223. Huang Z, Santi L, LePore K, Kilbourne J, Arntzen CJ, Mason HS. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 2006; 24: 2506–2513)
224. Milich DR, Schöder F, Hughes JL, Jones JE, Peterson DL. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype *J Virol*. 1997;71: 2192-2201.
225. David R. Milich, Margaret K. Chen, Janice L. Hughes, and Joyce E. Jones The Secreted Hepatitis B Precore Antigen Can Modulate the Immune Response to the Nucleocapsid: A Mechanism for Persistence. *J Immunol*. 1998;160: 2013-2021.
226. Zhang GG, Li DX, Zhang HH, Zeng YM, Chen. Enhancement of mucosal immune response against the M2eHBc+ antigen in mice with the fusion expression products of LTB and M2eHBc+ through mucosal immunization route *Vet Res Commun*. 2009; 33: 735-747.

227. Milich DR, McLachlan A, Moriarty A, Thornton GB. Immune responses to hepatitis B virus core antigen (HBcAg): localization of T cell recognition sites within HBcAg/HBeAg. *J of Immunology*. 1987; 139: 1223-1231.
228. Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of the hepatitis B virus is both a T-cell independent and a T-cell dependent antigen. *Science*. 1986; 234: 1398-1401.
229. Davison F, Kaspers B, Schat KA. *Avian immunology*. First ed, 2008.
230. Wieland WH, Orzaez D, Lammers A, Parmentir H, Versteegen MWA. A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus domesticus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem. J*. 2004; 380: 669-676.
231. Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol*. 1987; 40:153-245.
232. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. 1999; 20: 141-151.
233. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense. *Ann. Intern. Med*. 1987; 106: 892-899.
234. Ogra PL, Faden H, Welliver RC. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14: 430-445.
235. MacDonald TT. The mucosal immune system. *Parasite immunology*. 2003; 25: 235-246.
236. Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H, McGhee JR. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 3310-3315.
237. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol*. 1998; 160: 5815-5825.
238. Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today*. 1999; 20: 267-277.

239. Mestecky J, Fultz PN. Mucosal immune system of the human genital tract. *J Infect Dis.* 1999; 179: S470–S474
240. Crowley-Nowick PA, Bell MC, Brockwell R, Edwards RP, Chen S, Partridge EE, Mestecky J. Rectal immunization for induction of specific antibody in the genital tract of women. *J Clin Immunol.* 1997 Sep; 17:370-379.
241. Stevceva L, Abimiku AG, Franchini G. Targeting the mucosa: genetically engineered vaccines and mucosal immune responses *Genes Immun.* 2000; 1: 308-315.
242. Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci.* 2004;11: 426-438.
243. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58: 4-43.
244. Propst SM, Denson R, Rothstein E, Estell K, Schwiebert LM. Proinflammatory and Th2 Derived Cytokines Modulate CD40 Mediated Expression of Inflammatory Mediators in Airway Epithelia Implications for the Role of Epithelial CD40 in Airway Inflammation. *J Immunol.* 2000; 165: 2214-2221.
245. Schönbeck U, Mach F, Libby P. CD154 (CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 687-693.
246. Stout RD, Suttles J. The many-roles of CD40 in cellmediated inflammatory responses. *Immunol Today.* 1996; 17: 487-492.
247. Déchanet J, Grosset C, Taupin JL, Merville P, Banchereau J, Ripoche J, Moreau JF. CD40 ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol.* 1997; 159: 5640-5647.
248. Kooten CV, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 2-17.
249. Tregaskes CA, Glansbeek HL, Gill AC, Hunt LG, Burnside J, Young JR. Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Dev Comp Immunol.* 2005; 29: 361-374.
250. Fanslow WC, Srinivasan S, Paxton R, Gibson MG, Spriggs MK, Armitage RJ. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol.* 1994; 6: 267-278.

251. Gares SL, Fischer KP, Congly SE, Lacoste S, Addison WR, Tyrrell DL, Gutfreund KS. Immunotargeting with CD154 (CD40 Ligand) Enhances DNA Vaccine Responses in Ducks. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13: 958-965.
252. Grammer AC, Lipsky PE. CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv Immunol* 2001; 76: 61-178.
253. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Hausser A, Glauner H, Samel D, Graness A, Scheurich P, Mauri D, Wajant H. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor TRAF 1 Regulates CD40-induced TRAF2 mediated NF, B Activation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 677-685.
254. Kawai M, Masuda A, Kuwana M. A CD40-CD154 interaction in tissue fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 3562-3573.
255. Sun Q, Li W, She R, Wang D, Han D, Li R, Ding Y, Yue Z. Evidence for a role of mast cells in the mucosal injury induced by Newcastle disease virus *Poult Sci.* 2009; 88: 554-561.
256. Graf D, Müller S, Korthäuer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 1749-1754.
257. Manoj S, Griebel PJ, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Targeting with Bovine CD154 Enhances Humoral Immune Responses Induced by a DNA Vaccine in Sheep. *J Immunol.* 2003; 170: 989-996.
258. Fischer KP, Gares SL, Wang D, Lorne Tyrrell D, Gutfreund KS. Identification and characterization of functional CD154 (CD40 ligand) in the Pekin duck. *Dev Comp Immunol.* 2007; 31: 61-71.
259. Kothlow S, Morgenroth I, Tregaskes CA, Kaspers B, Young JR. CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Dev Comp Immunol.* 2008; 32:1015-1026.
260. Qi CJ, Zheng L, Ma HB, Fei M, Qian KQ, Shen BR, Wu CP, Vihinen M, Zhang XG. A novel mutation in CD40 and its functional characterization. *Hum Mutat.* 2009; 30: 985-994.
261. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997; 159: 4772-4780.

262. Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanabe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H. Genomic Analysis of Two Avian (Quail and Chicken) MHC Regions. *J Immunol.* 2004; 172: 6751-6763.
263. Steinman RM. Dendritic Cells and the Control of Immunity: Enhancing the Efficiency of Antigen Presentation. *Dendritic cells and the control of immunity. Mt Sinai J Med.* 2001; 68: 160-166.
264. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 1995; 11:151-155.
265. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepúlveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, DEC-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Lysosomal Compartments. *J Cell Biol.* 2000; 30: 673-684.
266. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demareux N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. The Dendritic Cell Specific Adhesion Receptor DC SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *J Immunol.* 2001; 168: 2118-2126.
267. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii SI, Soares H, Brimnes KM, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC 205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *J Exp Med.* 2004; 199: 815-824.
268. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8 T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002; 196: 1627-1638.
269. Frank I, Piatak M Jr, Stoessel H, Romani N, Bonnyay D, Lifson JD, Pope M. Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol.* 2002; 76: 2936-2951.
270. Zitvogel L. Dendritic and Natural Killer Cells Cooperate in the Control/Switch of Innate Immunity. *J. Exp. Med.* 2002; 195: F9-F14.

271. Frank I, Piatak M Jr, Stoessel H, Romani N, Bonnyay D, Lifson JD, Pope M. Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol.* 2002; 76: 2936-2951.
272. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392: 245-252.
273. Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris).* 2003; 51: 59-60.
274. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004; 21: 527-538.
275. Pabst O, Ohl L, Wendland M, Wurbel MA, Kremmer E, Malissen B, Förster R. Chemokine Receptor CCR9 contributes to the Localization of Plasma Cells to the Small Intestine *J. Exp. Med.* 2004; 199: 411-416.
276. Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* 2008; 1: 96-109.
277. Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, Otipoby KL, Yokota A, Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science.* 2006; 314: 1157-1160.
278. Gamvrellis A, Leong D, Hanley JC, Xiang SD, Mottram P, Plebanski M. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82: 506-516
279. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, Ghildyal R, Vardaxis N, Plebanski M. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Mol Pharm.* 2007; 4: 73-84.
280. Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 166: 5346-5355.
281. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J: *Immunology.* 5. th. ed. W.H. Freeman, USA, 2003
282. Jeurissen SHM, Wagenaar F, Janse EM. Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken. *Poult. Sci.* 1999; 78: 965-972.

283. Gebert A, Steinmetz I, Fassbender S, Wendlandt KH. Antigen Transport into Peyer's Patches Increased Uptake by Constant Numbers of M Cells. *Am J Pathol.* 2004; 164: 65-72.
284. Harvey P, Battle T, Leach S. Different invasion phenotypes of *Campylobacter* isolates in Caco-2 cell monolayers *J Med Microbiol.* 1999; 48: 461-469.
285. Kaiserlian D, Etchart N: Entry sites for oral vaccines and drugs: a role for M cells, enterocytes and dendritic cells? *Semin Immunol.* 1999; 11: 217-224.
286. Tyrer P, Foxwell AR, Cripps AW, Apicella MA, Kyd JM. Microbial Pattern Recognition Receptors Mediate M-Cell Uptake of a Gram-Negative Bacterium. *Infect Immun.* 2006; 74: 625-631.
287. Hamad ARA, Marrack P. Transcytosis of Staphylococcal Superantigen Toxins, *J. Exp. Med.* 1997; 185: 1447-1454.
288. Kyd JM, Cripps AW. Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine.* 2006; 26: 6221-6224.
289. Grens PPE. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes. *Intervirology.* 2001; 44: 98-114.
290. Vega M, Santos-Argumedo L, Huerta-Yepez S, Luria-Perez R, Ortiz-Navarrete V, Isibasl A, Gonzalez-Bonilla CR. A *Salmonella typhi* OmpC fusion protein expressing the CD154 Trp 140-Ser 149 amino acid strands binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line. *Immunology.* 2003; 110: 206-216.
291. Layton SL, Kapczynski DR, Higgins S, Higgins J, Wolfenden AD, Liljebjelke KA, Bottje WG, Swayne D, Berghman LR, Kwon YM, Hargis BM, Cole K. Vaccination of chickens with recombinant *Salmonella* expressing M2e and CD154 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge. *Poultry Science.* 2009; 88: 2244-2252.
292. *Molecular cloning a laboratory manual third edition*, Sambrook J, Russel D. W. 2000
293. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 1995;268:714-6
294. Datos no publicado, Layton SL *et al.* 2010.

295. Pawelec DP, Korsak D, Wyszynska AK, Rozynek E, Popowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. Genetic diversity of the *Campylobacter* genes coding immunodominant proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 185: 43-49.
296. Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2005; 57: 733-753.
297. Huang Z, Mason H. Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Biotech J* 2004; 2: 241-249.
298. Purchase HG, Lawrence AH, Domermuth CH, Pearson JE. *A laboratory Manual for the isolation and identification of avian pathogens.* 3rd ed. Pennsylvania United States 1989
299. Ska°nsenga B, Kaldhusdalc M, Rud K. Comparison of chicken gut colonization by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Molecular and Cellular Probes.* 2006; 20: 269-279.
300. Andrews EJ, Bennett BT, Clark JD, Houpt KA, Pascoe PJ, Robinson GW, Boyce JR. Report of the AVMA Panel on Euthanasia: American Veterinary Medical Association. *JAVMA* 1993; 202 : 229-249
301. Mardia KV, Kent JT, Bibby JM. (1979). *Multivariate Analysis.* Academic Press. ISBN 0-12-471252-5
302. SAS users guide: statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C.