

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“USO DE PORINAS DE *Salmonella* enterica serovar  
Typhi COMO ADYUVANTE DE UNA VACUNA  
INACTIVADA CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA  
AVIAR DE USO VETERINARIO”

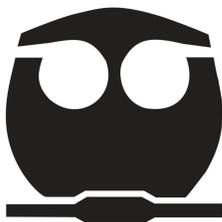
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA

FÁTIMA SOFÍA MAGAÑA GUERRERO



MÉXICO, D.F.

2011



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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

Vocal: Dr. Constantino III Roberto López Macías

Secretario: M en C. Mario Adán Moreno Eutimio

1er. Suplente QFB. Julio César Martínez Alvaréz

2do. Suplente QFB. Gibran Pérez Montesinos

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades, en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Constantino III Roberto López Macías

**ASESOR**

M en C. Mario Adán Moreno Eutimio

**SUPERVISOR TÉCNICO**

Fátima Sofía Magaña Guerrero

**SUSTENTANTE**

## DEDICATORIA

*A MI FAMILIA QUE SIEMPRE ME APOYA.*

*A MIS AMIGOS QUE HAN COMPARTIDO SU TIEMPO Y AMISTAD CONMIGO.*

*A TODOS LOS QUE CREEN Y CREYERON EN MI.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Isibasi por brindarme la oportunidad de trabajar en este trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica.

Al Dr. Constantino por su confianza permitirme participar en este trabajo a su cargo e instrucción en mi formación.

Al Dr. Rodolfo Pastelín por toda su ayuda y consejos para la realización y finalización de este trabajo.

Al cDr Mario Adán por haberme apoyado e instruido en el trabajo realizado, por sus consejos y enseñanzas.

A la empresa AVIMEX , S.A, de C.V. Al Dr. Manuel Gay, MVZ. Emmanuel y MVZ Francisco Quezada por permitirme ser partícipe del trabajo realizado y apoyarme en el mismo.

El presente proyecto fue financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF): con número de proyecto R- 2009-785-084 a través del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/713) otorgado al Dr. Constantino López Macías,.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en C. Mireille Gutiérrez por lo todo lo que me ha y sigue enseñando, por su apoyo, instrucción, consejos y amistad.

A la pQFB Evelin Morales Nuño por ser mi compañera y amiga en todo este tiempo, por lo que hemos compartido y trabajado juntas.

A la Dra. Ilka Boscó Garate y M.H. Gabriela Cureño , por brindarme su amistad y apoyo en muchos momentos.

A Rafael, Griselda, Mauricio, Gustavo, Jaquelin, e Ismael, por hacer la estancia en el peine más agradable y divertida.

A Ismael, Esteban, Alexis y Luis Ángel por su ayuda y hacer divertida la estancia en el laboratorio.

A Adriana, Núriban, Marisol, Raúl, Pablo y Hisaki, por darme recomendaciones y ayuda en la realización de este trabajo.

## **FINANCIAMIENTO**

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito del Federal (ICyTDF), a través del Fondo en Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS / IMSS/ PROT/ 713).

Beca proporcionada por estudios proporcionada por el proyecto número R-2009-785-084 a través del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/713)

## ÍNDICE:

ABREVIATURAS:.....	10
1. RESUMEN .....	13
2. INTRODUCCIÓN .....	15
2.1 Composición del virus de influenza.....	11
2.2 Genoma del virus de influenza.....	12
2.3 El Virus de influenza aviar y su impacto epidemiológico.....	13
2.4 Proteínas de membrana externa (PME).....	15
2.5 Porinas de <i>Salmonella</i> enterica serovar Typhi.....	16
2.6 Activación de la respuesta inmune por las porinas de <i>Salmonella typhi</i> .....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA: .....	27
4. HIPÓTESIS: .....	28
5. OBJETIVO GENERAL:.....	29
6. OBJETIVOS PARTICULARES:.....	29
7. MATERIALES.....	31
7.1 Porinas de <i>Salmonella</i> enterica serovar Typhi .....	31
7.2 Cepas de virus de influenza aviar.....	31
7.3 Cepa bacteriana .....	31

7.4 Animales de laboratorio.....	31
8. MÉTODOS .....	32
8.1 Evaluación de la presencia de las porinas de <i>S. typhi</i> de la emulsión vacunal mediante inmunoprecipitación, PAGE-SDS y Western Blot.....	30
8.2 Inmunización de los grupos de estudio. ....	32
8.2 Reto con la cepa de VIAAP- H5N2 de los grupos vacunados.....	35
8.3 Evaluación de la morbilidad y mortalidad de los grupos de estudio. ....	36
8.4 Determinación de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos, mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). ....	37
8.5 Determinación de anticuerpos $\alpha$ - <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S.gallinarum</i> inducidos por el uso de las porinas como adyuvante .....	40
9. RESULTADOS .....	42
9.1 Identificación de las porinas de <i>S. typhi</i> en la emulsión vacunal.....	37
9.2 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de <i>S. typhi</i> induce protección. ...	42
9.3 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de Ag adyuvantada con las porinas de <i>S. typhi</i> induce la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.....	47

9.4 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de Ag adyuvantada con las porinaa de <i>S. typhi</i> induce una respuesta de anticuerpos de memoria.....	49
9.5 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de <i>S. typhi</i> no induce la producción de anticuerpos anti- <i>S typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S. gallinarum</i>	51
10. DISCUSIÓN.....	57
11. CONCLUSIONES.....	60
12. ANEXO .....	61
- Elaboración de las vacunas inactivadas sin y con porinas.....	42
- Elaboración del antígeno de VIABP para HI.....	61
- Solución amortiguadora de citratos (SBC).....	63
- Solución amortiguadora de carbonatos (SAC).....	64
- Solución de bloqueo .....	64
- Solución de lavado.....	64
- Solución de revelado .....	64
- Solución 0.5% de ckRBC.....	63
-Buffer base para inmunoprecipitación.....	63
-Buffer de lavado para inmunoprecipitación.....	63
13. REFERENCIAS.....	66

## ABREVIATURAS:

aSi	Ácido siálico
DIEP 50%	Dosis infectiva de embrión de pollo 50 %
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli.</i>
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
HA	Hemaglutinina
HEL	Lisozima de huevo de gallina
HI	Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación
IP	Inmunoprecipitación
KDa	Kilodaton
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2 (Canales iónicos)
NA	Neuraminidasa
NEP/NS2	Proteína Exportadora Nuclear/ proteína no estructural 2
nm	Nanómetros
NS1	Proteína no estructural 1

OPD	Ortofenilendiamina
OVA	Ovoalbúmina
PA	Subunidad ácida de la RNA polimerasa
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PB1	Subunidad 1 básica de la RNA polimerasa
PB2	Subunidad 2 básica de la RNA polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PME	Proteína de membrana externa
PRR's	Receptores de Reconocimiento a Patrones
RNA	Cadena de ácido ribonucleico
<i>S.gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> enterica serovar Gallinarum
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella</i> enterica serovar Typhi
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> enterica serovar Typhimurium
SFP	Libres de Patógenos Específicos
SDS	Duodecil sulfato de sodio
TLR	Receptores Tipo Toll
UHA	Unidades Hemaglutinantes

VIAAP Virus de Influenza Aviar de Alta  
Patogenicidad

VIABP Virus de Influenza Aviar de Baja  
Patogenicidad

## 1. RESUMEN

Diversas enfermedades son causadas por agentes infecciosos virales como el virus de influenza A que genera a una enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior, que se presenta como una gripe común, con fiebre, tos, garganta reseca y dolor muscular; en algunos casos más severos se puede desarrollar neumonía e incluso llevar a la muerte. Los virus influenza A presentan una alta variabilidad genética que les permite ser transmitidos a diversos hospederos además de sus hospederos naturales como son las aves domésticas y de vida libre, cerdos, caballos y seres humanos; por lo tanto una de las mejores estrategias para el control de la transmisión del virus de influenza y la eliminación de sus hospederos naturales es la vacunación, cuyo principal objetivo es establecer una respuesta inmune protectora y de larga duración contra un antígeno[1], Este objetivo se ha logrado con éxito con el uso de vacunas basadas en virus atenuados, sin embargo, el riesgo de contraer la enfermedad resulta alto, lo que a llevado al uso de vacunas basadas en virus inactivados, desafortunadamente la baja capacidad de inducir una respuesta inmune protectora, ha llevado a la necesidad de utilizar gran cantidad de antígeno. Por lo que se ha requerido la búsqueda de compuestos o moléculas capaces de potenciar la respuesta inmune conocidos como adyuvantes, dentro de esta búsqueda de nuevas moléculas se han estudiado a las porinas que son proteínas de la membrana externa bacterias gram negativas que forman una estructura homotrimérica cuya función es la formación de poros para el paso de moléculas a través de la membrana. En *Salmonella typhi* se encuentra las porinas OmpC y OmpF, las cuales son capaces de inducir una respuesta de

anticuerpos de larga duración, de activar células de la respuesta inmune a través de los receptores tipo Toll (TLRs) y presentar capacidad adyuvante intrínseca cuando se co-administran con antígenos modelo, poco inmunogénicos. Estos datos permiten sugerir que las porinas de *S. typhi* son un buen candidato para ser usados como adyuvantes, para el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales o el mejoramiento de las vacunas ya existentes. El uso de un adecuado adyuvante además de potencializar la respuesta inmune contra el antígeno nos permite disminuir la cantidad de antígeno, por lo que nos dimos a la tarea de evaluar el efecto adyuvante de las porinas de *S. typhi* en una vacuna inactivada del virus de influenza aviar, para lo cual se inmunizaron grupos de pollos libres de patógenos específicos (SPF) con la formulación vacunal adyuvantada con las porinas, se determinó la morbilidad y mortalidad de las aves, así como la inducción de anticuerpos contra el virus y la respuesta de memoria generada por la vacuna, mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Composición del virus de influenza.

Los virus de influenza pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*, son capaces de infectar a una gran cantidad de hospederos entre los que se encuentran aves silvestres y domésticas, cerdos, caballos y el ser humano[2]. De acuerdo a sus glicoproteínas de superficie y de matriz los virus de influenza se clasifican en *influenzavirus A*, *influenzavirus B* e *influenzavirus C*, estas glicoproteínas corresponden a las proteínas transmembranales hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) que permiten la fusión y entrada del virus a las células del hospedero que junto con la proteína M2 (canales iónicos) corresponden a los componentes principales del virus, además de la proteína M1 (proteína de matriz) la cual funciona como soporte para estas proteínas transmembranales y encierra el contenido del virus. En la parte interna de la M1 se encuentran otras proteínas como NEP / NS2 (proteína exportadora nuclear ó proteína no estructural 2); así como el complejo ribonucleoproteico que consiste en segmentos de RNA unido a nucleoproteínas y la heterotrimérica RNA-polimerasa compuesta por dos subunidades básicas (PB1 y PB2) y por una subunidad ácida (PA).[1, 2]

### 2.2 Genoma del virus de influenza

El genoma de los virus de influenza A y B está compuesto por ocho segmentos de RNA de una sola cadena y polaridad negativa; los segmentos 1, 3, 4 y 5 codifican a las proteínas PB2, PA, HA y NP; la

subunidad PB1 es codificada por el segmento 2; el segmento 6 codifica a la glicoproteína neuraminidasa, por otro lado el segmento 7 codifica a la proteína M1 y por un mecanismo de corte y empalme (splicing) del RNA a la proteína M2. Por último el segmento 8 codifica una proteína no estructural 1 (NS1)[1]

**Tabla 1.** Proteínas codificada por los segmentos del genoma del virus de influenza tipo A y su función. Modificado de *Bouvier et al*[1]

Número de segmento	Proteína codificada	Función de la proteína
1	PB2	Subunidad de polimerasa: reconocimiento del cap del mRNA
2	PB1  PB1-F2	Subunidad de polimerasa; alargamiento de RNA, actividad de endonucleasa  Función pro-apoptótica, en ciertas cepas únicamente.
3	PA	Subunidad de polimerasa; actividad de proteasa

4	HA	Glicoproteína de superficie; antígeno principal, involucrado en fusión y unión a receptor de aSi
5	NP	Proteína de unión a RNAv; regulación del importe nuclear
6	NA	Glicoproteína de superficie, actividad de sialidasa, involucrada en la liberación del virón
7	M1  M2	Proteína de matriz, interacción con vRNP, regulación del exporte nuclear del RNAv.  Canal iónico, involucrado en liberación del virus y ensamblaje
8	NS1  NS2	Proteína antagonista de acción del interferón, involucrado en regulación de la expresión de genes del hospedero  Exporte nuclear de RNAv

### 2.3 El Virus de influenza aviar y su impacto epidemiológico

El virus de influenza aviar pertenece a los *influenzavirus A*, por lo que comparte la misma composición con el resto de los virus de esta familia, sin embargo se ha encontrado que este virus presenta variantes de sus glicoproteínas de superficie, estas corresponden en 16 para la hemaglutinina y 9 para la neuraminidasa lo que permite clasificarlo en sus diferentes subtipos.[3] En suma a todo esto se sabe que los virus de influenza aviar de baja patogenicidad se encuentran propagados en la naturaleza y que el principal reservorio de estos subtipos corresponde a aves de humedales y de ambientes acuáticos, ya que las más de 26 familias de virus conocidas se han aislado de un número de 105 aves aproximadamente [4] Una de las características más importantes desde un panorama epidemiológico que poseen los virus de influenza incluyendo los *influenzavirus A* es su alta tasa de modificación genética que les permite adquirir características que pertenecen a los virus de alta patogenicidad, lo que favorece su transmisión hacia países en los que es poco frecuente su presencia, así como la capacidad de infectar a otros hospederos no naturales, como el ser humano. Existen algunos casos reportados de este tipo de fenómenos de transmisión del virus aviar, los cuales corresponden a cepas que fueron aisladas en Sudamérica en el año 2002 en una granja comercial en Chile y en Bolivia en el 2001, y que se encuentran íntimamente relacionadas con algunos virus de influenza aviar de alta patogenicidad puesto que comparten seis de los ocho segmentos de material genético [5, 6]

El genoma de los virus de influenza es susceptible a mutaciones relacionadas con su alta tasa de replicación y a la naturaleza del material genético esto debido a que la RNAv polimerasa carece de actividad para corregir errores ocurridos durante el proceso de replicación, lo que da origen a la acumulación de un alto número de mutaciones en el material genético que pueden ser de tipo silencioso o bien dar origen a sustituciones de aminoácidos que pueden generar cambios en las proteínas expresadas y un cambio antigénico de las mismas conocido como deriva (*antigenic drift*); además de este mecanismo de modificación del material genético, lo virus de influenza tiene la capacidad de intercambiar segmentos completos de su genoma puesto que sus genes se encuentran codificados en genes separados, este intercambio ocurre entre otras cepas variantes de virus, lo que permite generar nuevas cepas con capacidad de supervivencia y conservación en el ambiente conocido como cambio antigénico (*antigenic shift*). [7] La capacidad que poseen los virus de influenza de realizar mecanismos que incrementan su variabilidad genética, les permite adquirir la capacidad de infectar a otros hospederos no naturales, esto se encuentra ejemplificado en casos reportados donde se aisló el virus de influenza aviar subtipo H9N2 en el año de 1997 en una población del sureste de China [8], este virus fue relacionado con la presencia de un cuadro clínico semejante al reportado en casos de influenza de baja severidad, así mismo se encontró que las cepas de este subtipo de virus han generando una mejor adaptación hacia el hospedero humano adquiriendo la capacidad de replicarse con mayor efectividad en las células epiteliales alveolares lo que favorece su propagación y supervivencia [7,8].

A lo largo de la historia se han generado tres pandemias con altas cifras de mortalidad causadas por la alta variabilidad genética que presentan este tipo de virus, estas pandemias corresponden a la “gripe española” en 1918 - 1919, “gripe asiática” 1957-1958 y “gripe de Hong Kong” de 1968-1969. Así como la reciente pandemia originada en México de 2009 causada por el virus de influenza A (H1N1). [2, 9, 10]

Los altos índices de mortalidad refieren a la influenza como un problema de importancia en salud, para el cual es necesario buscar estrategias que impidan su transmisión y propagación, una de las mejores estrategias para el control de enfermedades infecciosas como la influenza es la vacunación, la cual tiene como objetivo principal el establecer una respuesta inmune específica y de larga duración contra un antígeno [11], sin embargo, este no siempre es posible, debido al bajo grado de inmunogenicidad de los antígenos empleados en vacunas, lo que ha requerido la búsqueda de compuestos o moléculas capaces de potenciar la respuesta inmune contra un antígeno específico, denominados adyuvantes.

Uno de los problemas principales que se presenta en la elaboración de vacunas es la poca inmunogenicidad de los antígenos usados por lo que para generar una respuesta adecuada se requiere del uso de grandes cantidades de estos antígenos, otros problemas que se presentan en el diseño de vacunas es la poca complejidad de los antígenos empleados y la poca duración de la respuesta generada. Por lo que los adyuvantes tienen un papel clave en la mejora de las preparaciones vacunales puesto que corresponden a un grupo de moléculas con la capacidad de incrementar la repuesta inmune inducida por un antígeno poco inmunogénico, y su uso

permite la disminución en la cantidad de antígeno usado, además de que logran incrementar la respuesta generada contra el antígeno[12]; todo esto debido a que permiten una mayor exposición del antígeno lo que favorece su procesamiento y presentación además de inducir el reclutamiento de células de la respuesta inmune hacia la zona de aplicación, inducen la activación de la respuesta inmune ya que favorecen la fagocitosis por las células dendríticas y la activan al inflamosoma.[11, 13]

Algunas moléculas adyuvantes usadas para vacunas corresponden a productos microbianos, sales minerales como la alúmina y emulsiones un ejemplo de estas últimas es el adyuvante de Freund, el cual corresponde a una emulsión de aceite mineral, lanolina y bacilos de micobacterias muertos.[11] La inyección de esta mezcla ocasiona una reacción local inflamatoria severa, por lo que su uso en humanos está prohibido solo se permite su uso en algunos ensayos de investigación que cuenten con un respectivo permiso de su empleo en animales experimentales. En algunas preparaciones vacunales veterinarias contra influenza aviar se emplea un adyuvante en base a aceite mineral el cual genera una reacción parecida a la de Freud durante su aplicación. Por lo que se ha recurrido a la búsqueda de nuevas moléculas capaces de aumentar la inmunogenicidad, siendo eficaces, seguros y con bajo costo.[14]

Desde hace algunos años compañías y centros de investigación incluyendo la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) han enfocado sus estudios en la búsqueda de nuevas moléculas que permitan a las vacunas generar un estado protector de larga duración con el objetivo de disminuir el número de dosis de las mismas y disminuir costos de

producción. Por lo que uno de los objetivos principales es el encontrar una molécula que cuente con una mayor capacidad inmunopotenciadora, que permita disminuir la dosis de antígeno vacunal permitiendo una mayor cobertura y disminuir el costo de la preparación vacunal.

Debido a lo anterior en la UIMIQ se han desarrollado ensayos para estudiar las propiedades de un grupo de proteínas de la membrana externa de bacterias gran negativas como lo son las porinas de *S. typhi*, con el objetivo de encontrar una nueva molécula que sea capaz de potenciar la respuesta inmune al ser empleadas en una vacuna.

#### **2.4 Proteínas de membrana externa (PME)**

Las PME corresponden a un grupo de proteínas que se encuentran ancladas en la membrana externa de las bacterias gran negativas. Su expresión puede verse afectada por diferentes factores como lo son las condiciones de cultivo, la temperatura, la osmolaridad y el pH, entre otras [15, 16]. Estas proteínas se clasifican en proteínas principales y proteínas menores, las proteínas principales corresponde aquellas que pueden llegar a expresarse en más de 100 000 moléculas por bacteria. Dentro de este tipo de proteínas se encuentran las proteínas matrices o porinas que tienen un peso molecular entre 36 KDa y 42 KDa. Participan en el transporte pasivo de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana externa. Como ejemplo de estas proteínas se encuentran OmpC, OmpF, OmpD y PhoE. [15, 17]. Las proteínas menores corresponden a un grupo de proteínas que funcionan como acarreadores durante el transporte de sustancias de alto peso

molecular, además de estar involucradas en la división celular. Como ejemplos se encuentran la OMPLA, y las PME que poseen actividad de fosfolipasa A. [18]

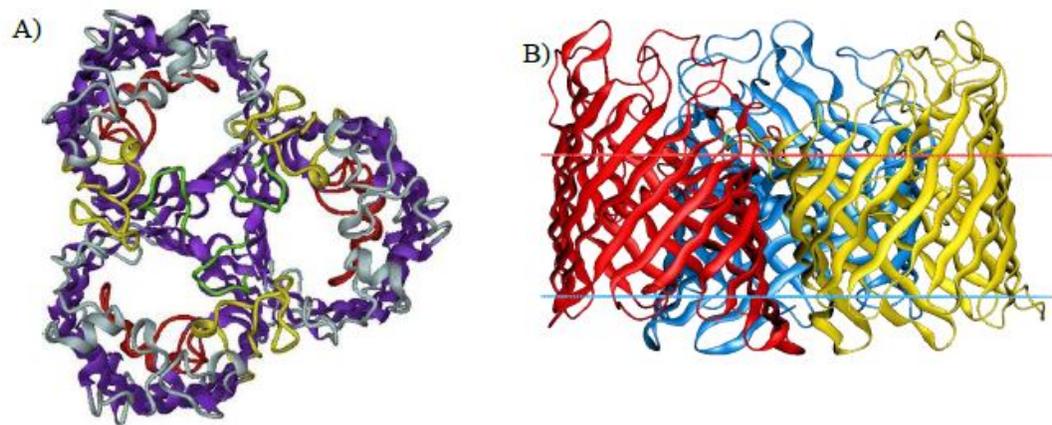
## **2.5 Porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhi,**

*Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) esta bacteria al igual que otras bacterias gram negativas como *E.coli* expresa en su superficie proteínas de membrana externa que pertenecen al grupo de las porinas que son proteínas que forman canales o poros que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas con límite de exclusión de solutos de aproximadamente 0.6 KDa. [19, 20]. Estas proteínas transmembranales se ensamblan como trímeros de subunidades idénticas, de forma cilíndrica semejante a un barril y cada homotrímero es muy estable a la acción de detergentes y proteasas [21].

*S. typhi* es capaz de expresar en su membrana porinas denominadas mayoritarias y minoritarias, entre las proteínas mayoritarias se encuentran OmpC y OmpF con un peso molecular de 36 KDa y 34 KDa respectivamente, mientras que las proteínas minoritarias corresponden a las porinas OmpS1 y OmpS2 las cuales no se logran detectar en condiciones estándares de crecimiento. [19, 20]

Algunas observaciones de las estructuras cristalográficas de las porinas OmpF y OmpC (2 Å) de *E. coli* muestran la unidad estructural (monómero) en forma de barril o cilindro con estructuras  $\beta$  plegadas formadas por 16 regiones de hojas anti-paralelas enlazadas con sus extremos por 8 asas

largas externas y 8 asas cortas hacia el espacio periplásmico.[17] La cantidad de porinas presente en la membrana externa es relativamente constante, aproximadamente de  $1 \times 10^5$ , siendo además, las proteínas más abundantes en términos de masa, ya que pueden llegar a representar hasta un 2% de las proteínas totales de la célula.[22]



**Figura 1. Modelo tridimensional de la porina OmpC de *E. coli*.** A) En color morado se observan las estructuras  $\beta$  plegadas, éstas son unidas por asas externas observadas en color amarillo y asas internas de color rojo. Vista por arriba. B) Trímero de la porina OmpC de *E. coli* vista de lado (Tomado de Basle *et al.*, 2006).[23]

## 2.6 Activación de la respuesta inmune por las porinas de *S.typhi*.

Estudios realizados sobre las propiedades de las porinas de *S.typhi* han demostrado que estas son muy inmunogénicas ya que inducen protección en el modelo del ratón hasta contra 500 dosis letales media del reto con *S. typhi* [19, 21] y son el blanco de la respuesta inmune humoral en pacientes

con fiebre tifoidea. La alta inmunogenicidad y capacidad de activación de la respuesta inmune por parte de las porinas permite sugerir que estas moléculas poseen propiedades adyuvantes intrínsecas.[24-26]

Se ha reportado la actividad adyuvante de proteínas semejantes a las porinas de *S. typhi* como son las porinas de *N. meningitidis*, estas proteínas son inmunogénicas en animales y en humanos en ausencia de adyuvantes, y además son ligandos de TLR2.[25, 27] Han sido utilizadas en fase experimental como adyuvantes en preparaciones vacunales polisacáridicas y de péptidos, tal es el caso de meningococo, neumococo, malaria, entre otras.[27-31]

Estudios recientes han mostrado que las porinas de *S. typhi* son capaces de señalar a través de receptores tipo Toll 2 y TLR 4 (TLRs), además inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 en células presentadoras de antígeno [24]. También se encontró que las porinas de *S. typhi* inducen un efecto adyuvante sobre antígenos modelo, poco inmunogénicos como es la lisozima de huevo de gallina (HEL) u Ovoalbumina (OVA). La co-administración de porinas de *S. typhi* con HEL genera un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos específicos contra HEL que se mantiene hasta 400 días post inmunización, resultados semejantes se encontraron cuando se co-administra HEL

Otros estudios encontraron que la co-administración de la porina OmpC como adyuvante con una vacuna comercial contra la influenza humana, aumenta de manera significativa la protección de larga duración [28].

Los datos anteriores donde las porinas son capaces de inducir un efecto adyuvante de larga duración en la respuesta humoral contra antígenos modelo y ser consideradas PAMP, sugieren que podrían ser moléculas candidato para utilizarse como adyuvantes para la generación de inmunidad de larga duración al aplicarlas junto con vacunas ya empleadas.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Es necesario contar con moléculas que posean capacidad adyuvante intrínseca que permitan disminuir la dosis de antígenos vacunales empleados, para lograr una mayor cobertura, por lo que en el presente estudio se evaluará si el uso de las porinas de *Salmonella typhi* como adyuvante de una vacuna de virus inactivado de influenza aviar es capaz de disminuir a la mitad la dosis de antígeno e inducir una eficiente activación de la respuesta inmune y protección.

#### **4. HIPÓTESIS:**

El uso de las porinas de *S. typhi* como adyuvante de una vacuna inactivada contra el virus de influenza aviar permitirá reducir a la mitad el antígeno empleado e inducir protección.

## 5. OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la capacidad adyuvante de las porinas de *S. typhi* en una vacuna de virus de influenza aviar inactivado con la mitad de antígeno vacunal.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificación de las porinas de *S. typhi* en la nueva formulación vacunal adyuvantada con las porinas
- Evaluar la protección inducida por la vacuna de virus inactivado de influenza aviar adyuvantada con las porinas de *S. typhi*

Evaluar la morbilidad de los pollos vacunados con la vacuna de virus inactivado de influenza aviar adyuvantada con las porinas de *S. typhi* después del reto con el virus de influenza de alta patogenicidad.

▪

Evaluar los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos por una vacuna de virus de influenza aviar inactivado adyuvantada con las porinas de *S. typhi*.

- Evaluar la respuesta de anticuerpos de memoria inducidos por una vacuna de virus de influenza aviar inactivado adyuvantada con las porinas de *S. typhi*.

- Determinar la presencia de anticuerpos anti *S. typhi*, *S. thypimurium* y *S. gallinarum* en suero de pollos inmunizados con una vacuna de virus inactivado de influenza aviar adyuvantada con las porinas de *S. typhi* mediante la técnica de ELISA

## **7. MATERIALES**

### **7.1 Porinas de *Salmonella enterica serovar Typhi* .**

Se usaron porinas de *S. typhi* purificadas por el método de Nikaido modificado [14,15] ; con número de lote L-1102/4 a una concentración de 308 µg/ml. Conteniendo 6ng de LPS/10 microgramos de proteína.

### **7.2 Cepas de virus de influenza aviar.**

Se emplearon las cepas del virus de influenza aviar de baja patogenicidad (VIABP cepa 435) para la realización de las formulaciones vacunales y como antígeno en los ensayos de inhibición de la hemaglutinación además de la cepa viral VIAAP-H5N2 cepa IA /chicken /Querétaro/14588-19/95 usada para la realización del reto, proporcionada por la empresa AVIMEX, S.A de C.V.

### **7.3 Cepa bacteriana**

Se usaron las cepas bacterianas de *Salmonella enterica serovar Typhi*, ATCC 9993, 9,12 Vi: d , *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y *Salmonella enterica serovar Gallinarum* como antígenos para la realización de la técnica de ELISA.

### **7.4 Animales de laboratorio.**

Se emplearon pollos SFP de diez días de edad, que se mantuvieron en las unidades de Aislamiento INIFAP CENID-Microbiología.[32]

## 8. MÉTODOS

### 8.1 Identificación de las porinas de *S. typhi* de la emulsión vacunal.

Se usaron las técnicas de inmunoprecipitación , Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS , (PAGE-SDS) y Western Blot para realizar la identificación de las porinas de *S. typhi* en la nueva formulación de vacuna.

#### *8.1.1 Inmunoprecipitación*

Se colocaron 150  $\mu$ l de la fase acuosa de la emulsión vacunal (volumen con un contenido aproximado de 40  $\mu$ g de proteínas) en dos tubos ependorff debidamente rotulados.

Se agregaron 10 y 15  $\mu$ l del anticuerpo primario (anticuerpo de ratón anti-porinas) a cada tubo y se incubaron toda la noche a una temperatura de 4°C en rotación constante.

Se agregaron 50  $\mu$ l de la proteína G unida a sefarosaa cada tubo y se incubaron toda la noche a una temperatura de 4°C en rotación constante.

Después de la incubación se realizaron 2 lavados colocando 1mL de buffer de lavado y se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos a 4°C.

Finalmente se realizó un último lavado con 1ml de buffer de lavado centrifugando a 12 000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Se resuspendió el botón y se colocaron 50  $\mu$ l de buffer de carga para electroforesis (Buffer de Laemmli) , enseguida se calentaron las muestras a

95°C por 8 minutos para tener en condiciones reducidas las muestras y cargaron en el gel para la técnica de PAGE-SDS.

#### 8.1.2. PAGE-SDS

Se utilizaron 2 geles 12 % *Mini-PROTEAN TGX* marca *BIO RAD* se cargaron en los pozos la muestras, colocando en el carril 1 el marcador de peso molecular (*Broad range protein*, marca *Promega*) y en los carriles siguientes las muestras en condiciones reducidas.

El corrimiento de los geles se realizó en una cámara de electroforesis a 90 Volts. Después de terminado el corrimiento se detuvo la cámara y se colocó un gel en un recipiente con azul de Coomasie, se dejó teñir con el colorante durante 1 hr; posteriormente se colocó la solución de desteñido realizando cambios sucesivos de la solución hasta observarse en el gel solo las bandas de proteína teñidas, se enjuagó el gel con agua destilada y se secó.

#### 8.1.3 *Western Blot*.

Se transfirieron las bandas de proteína a una membrana usando en el equipo de transferencia *iBlot Gel Transfer System*, *Invitrogen*. Se realizó la transferencia a 23 volts durante 8 minutos por duplicado.

Una vez terminada la transferencia se procedió a bloquear los sitios inespecíficos con solución bloqueadora (leche descremada 5% en TBS) durante 1 hr y 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador oscilatorio a 60 rpm.

Se lavó la membrana con TBS-Tween 20 al 0.05% (TBS-T) 4 veces cada una por 5 minutos y una vez con TBS por 5 minutos.

Se adicionó el primer anticuerpo anti-porinas (usando un suero policlonal anti-porinas OmpC y OmpF) a una dilución 1:100 en solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBS). Se incubó por toda la noche a una temperatura de 4°C.

Después de la incubación se lavó con TBS-T, 6 veces cada una por 5 minutos y una vez con TBS por 5 minutos.

Se agregó el segundo anticuerpo *HRP-conejo anti ratón IgG1* en una dilución 1:200 en solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBS)

Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en el agitador oscilatorio a 60 rpm.

Se lavó con TBS-T, 4 veces cada una de 10 minutos con TBS-T y una vez con TBS por 5 minutos.

Una vez que se terminó de lavar la membrana, se adicionó la solución reveladora en base a el kit de revelado *BioRad* hasta observar bandas (revelado aproximado de 10 minutos).

Se lavó la membrana con agua destilada. Se secó y envolvió.

## **8.2 Inmunización de los grupos de estudio.**

Se inmunizaron 20 pollos SFP de diez días de edad por grupo, vía subcutánea en la porción media y posterior del cuello con las formulaciones

de vacuna y solución placebo siguientes usando una dosis de 0.5 mL (Tabla 2)

**Tabla 2: Formulaciones de vacunas y solución placebo usadas para la inmunización de los grupos de estudio.**

Grupo	Tipo de vacuna y contenido
VACUNA- AVIMEX 100% Ag	Vacuna inactivada contra IA emulsionada con 100% de Ag de VIABP cepa 435
VACUNA 50%Ag+ Porinas	Vacuna inactivada contra IA emulsionada con 50% de Ag de VIABP cepa 435 adicionada con 10 microgramos de las porinas de <i>S. typhi</i> por dosis contenidas en un volumen final de 0.5 ml
S/N VACUNA	Solución placebo ( líquido alantoideo 30% )

### 8.3 Reto con la cepa de VIAAP- H5N2 de los grupos vacunados

Al día veintiuno posterior a la inmunización, los grupos de animales fueron retados con el virus VIAAP-H5N2 cepa IA /chicken /Querétaro/ 14588-19/95 usando una dosis de  $10^{8.0}$  DIEP50%/ml, por cada pollo aplicando 0.06 ml en cada ojo (dos gotas) y 0.09 ml (3 gotas) en cada narina. Se determinó el grado de morbilidad y mortalidad durante 10 días.

#### **8.4 Evaluación de la morbilidad y mortalidad de los grupos de estudio.**

Los grupos de estudio fueron observados durante diez días después del reto, se evaluó el cuadro clínico de cada pollo asignando un valor numérico; el valor máximo de la severidad del cuadro clínico de cada grupo experimental es igual a la suma de los valores individuales registrados diariamente y el resultado final de cada grupo corresponde a la suma de los valores registrados durante los 10 días de la observación. (Tabla 3)

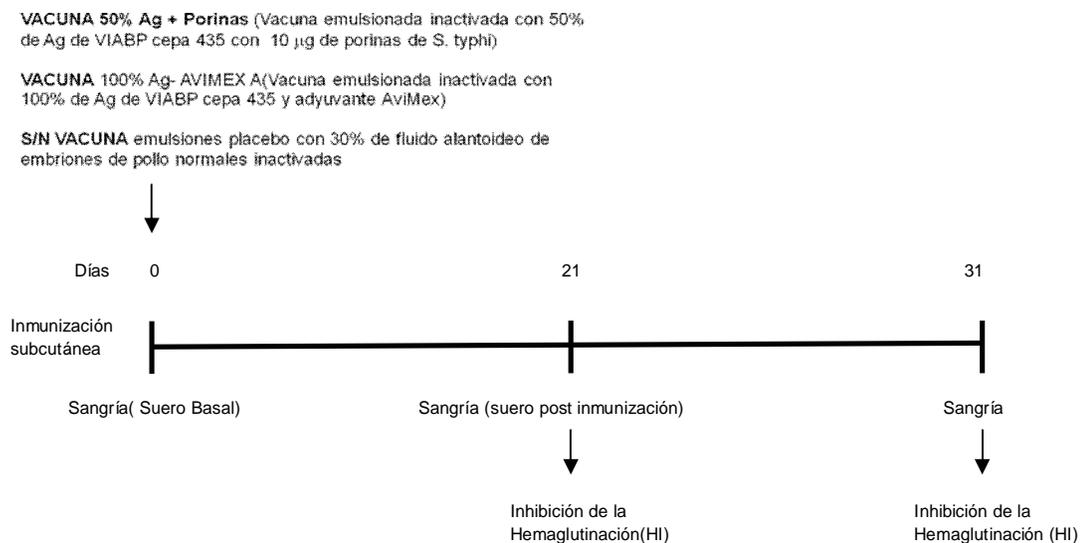
**Tabla 3: Valores asignados a los síntomas considerados para la evaluación diaria del cuadro clínico pos-reto de las aves con VIAAP-H5N2.**

<b>Signos clínicos</b>	<b>Ligero</b>	<b>Severo</b>
Conjuntivitis	<b>1</b>	<b>2</b>
Conjuntivitis + pluma erizada	<b>3</b>	<b>4</b>
Conjuntivitis + pluma erizada + postración	<b>5</b>	<b>6</b>
Muerte	<b>7</b>	

## 8.5 Determinación de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación inducidos, mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Se obtuvieron muestras de sueros de cada grupo experimental, pre-vacunación, al día veintiuno pos-vacunación y a los diez días después del reto, para la evaluación de la inducción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación determinándolos mediante ensayos de HI utilizando 4 UHA de antígenos del VIABP cepa-435.

**Figura 2. Esquema de inmunización de los grupos inmunizados y pruebas realizadas**



#### *8.5.1 Titulación del antígeno (VIABP cepa-435)*

Se colocaron 25  $\mu$ l de PBS en 12 pozos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pozos de fondo en "V", por duplicado. Enseguida se agregaron 25  $\mu$ l del VIABP cepa-435 en el primer pozo y se realizaron diluciones seriadas (de 1:2 hasta 1:1024) transfiriendo 25  $\mu$ l y desechando los 25  $\mu$ l finales hasta el pozo 10, dejando los dos últimos pozos como control de eritrocitos.

Se agregaron 25  $\mu$ l de PBS a los pozos y se adicionaron 25  $\mu$ l de solución de eritrocitos de pollo 1.0% a cada pozo, se homogenizó ligeramente la placa e incubó por 30 minutos aproximadamente o hasta la sedimentación de los eritrocitos de los pozos control.

Interpretación de la titulación del antígeno: El punto final de la titulación de antígeno es la dilución más alta del antígeno en la que se observe el 100% de hemaglutinación. Se considera que en esta dilución existe una unidad hemaglutinante (UHA). La dilución conteniendo las UHA deseadas del antígeno, se determina dividiendo el punto final de la hemaglutinación entre 4 para obtener 4 UHA en 25  $\mu$ l de suspensión del antígeno.[33]

#### *8.4.2 Ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IH).*

Se rotuló una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo en "V" de acuerdo al orden asignado para cada suero tratado, se agregaron 25  $\mu$ l de PBS a la placa (pozos 2-11); el pozo 12 se tomó como control de eritrocitos se le agregaron 50  $\mu$ l de PBS; posteriormente se adicionaron 25  $\mu$ L de cada

suero al primer pozo de la placa (A1-H1) después se transfirieron 25 µL de la primera columna hasta la columna número 10 , para realizar diluciones seriadas logarítmicas base 2 de los sueros, se descartaron los últimos 25 µL. A la placa con las diluciones se adicionaron 25 µL de la dilución del antígeno (VIABP cepa-435 a 4 UHA), se agitaron las placas por 10 segundos, con el fin de conseguir una mezcla homogénea; se realizó una incubación a temperatura ambiente ( 22-25°C) durante 30 minutos. Después de transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 25µL de una solución 1,0% de eritrocitos de pollo (ckRBC) previamente lavados a todos los pozos, enseguida se agitaron las placas e incubaron a temperatura ambiente (22-25°C) durante 30-45 minutos aproximadamente o hasta observar la sedimentación de los eritrocitos de los pozos control.

#### *8.4.3 Lectura del título inhibitorio.*

Se prosiguió con la lectura considerando el valor del título la última dilución donde se observa la ausencia de hemaglutinación. Para la realización de los gráficos se usó el valor del título como el logaritmo en base 2.

Los criterios usados para la lectura son los siguientes

- No hemaglutinación: Los ckRBC sedimentan en el fondo del pozo observándose como un botón.
- Hemaglutinación parcial: Se observa un anillo de células aglutinadas alrededor de un botón en el centro. No se lee como punto final de hemaglutinación.

- Hemaglutinación completa: Los ckRBC dan una capa fina y bien distribuida en el pozo. Se lee como punto final de la hemaglutinación.

Si ocurre la reacción antígeno/anticuerpo, la hemoaglutinación de los eritrocitos será inhibida y un botón se sedimentará en el fondo del pozo.[34]

### **8.5 Determinación de anticuerpos anti-*S. typhi*, anti-*S. typhimurium* y anti-*S. gallinarum* inducidos por el uso de las porinas como adyuvante**

Los sueros obtenidos de los grupos experimentales fueron evaluados para descartar la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -*Salmonella typhi*, anti-*S. typhimurium* y anti-*S. gallinarum* inducidos por el uso de las porinas de *S. typhi* en las preparaciones de vacunas usadas para inmunizar a los grupos experimentales para lo cual se realizó la técnica de ELISA.

Para la realización de esta técnica se emplearon placas de 96 pozos fijadas con solución amortiguadora de carbonatos a pH 9.5 con  $10^7$  UFC por pozo de las bacterias *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella gallinarum* inactivadas en un baño de agua a 70 °C durante 1 h y 30 minutos, posteriormente se realizó la incubación de las placas a 37°C durante 60 minutos y se prosiguió a bloquear los sitios de unión de los pozos con la proteína caseína usando para ello un solución de bloqueo preparada con PBS y leche descremada al 5%, realizando una incubación siguiente a 37° por 60 minutos.

Enseguida se lavaron las placas con solución de lavado (tween 20 al 0.01%) realizando 6 lavados a cada placa y un enjuague final con agua destilada, dando 6 pequeños golpes a cada lado de la placa , posteriormente sobre las placas ligeramente escurridas se colocaron las diluciones seriadas de las muestras a evaluar, hechas en un placa de dilución de 96 pozos que contenía 100  $\mu$ l solución de bloqueo en los pozos 2-12, al primer pozo se le colocan 195  $\mu$ l de la solución de bloqueo y 5  $\mu$ l del suero a evaluar para tener una dilución 1:40, enseguida se realiza la transferencia de 100  $\mu$ l del pozo 1 al pozo 2 y así sucesivamente hasta el pozo 12, homogenizando en cada ocasión. Después se incubaron las placas a 37° durante 60 minutos y se lavaron con solución de lavado realizando 6 lavados a cada placa y un enjuague final con agua destilada.

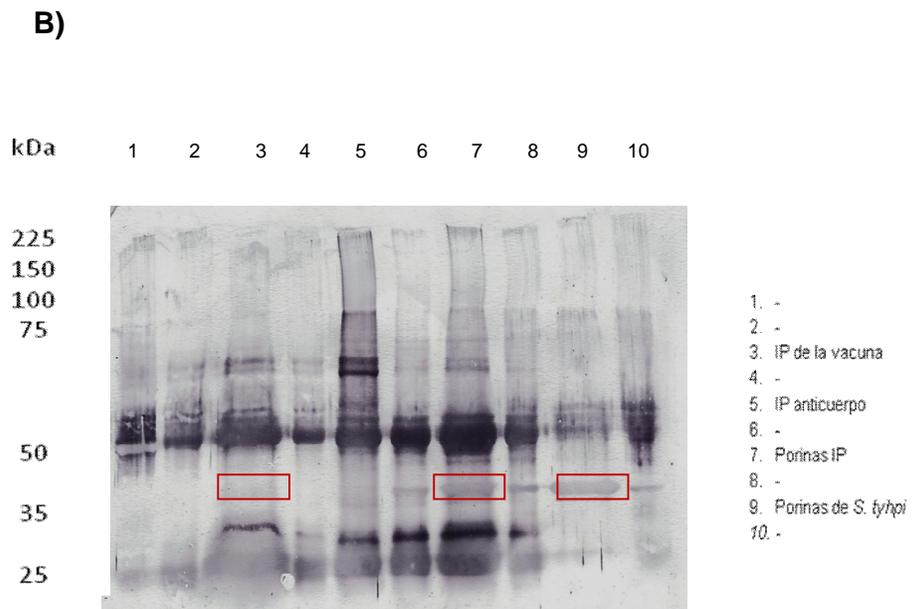
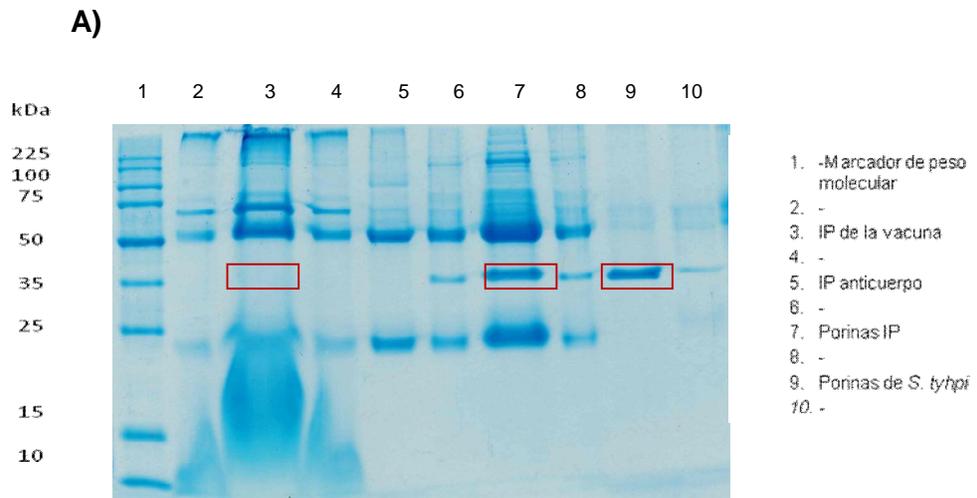
A las placas lavadas se les adicionó el anticuerpo secundario IgY HRP marcado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:20 000 en solución de bloqueo colocando 100  $\mu$ l por pozo, se incubaron nuevamente las placas a 37° por 60 minutos y lavaron.

Por último se revelaron las placas con una solución reveladora preparada con solución amortiguadora de citratos, OPD (ortofenilendiamina) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); se colocaron 100  $\mu$ l de la solución por pozo y se incubaron las placas a temperatura ambiente por 10 minutos en oscuridad, después de transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción con 10  $\mu$ l por pozo de ácido sulfúrico 2.0 N.

Finalmente las placas se leyeron en el lector de placas para ELISA DYNEX a 490 nm.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Identificación de las porinas de *S. typhi* en la emulsión vacunal.



**Figura 3. Identificación de las porinas de *S. typhi* usadas como adyuvante en la emulsión vacunal.** A) Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS con tinción de Azul de Coomassie, Se observan en los carriles 1.- Marcador de pesos molecular, 3.- vacuna inmunoprecipitada con 15  $\mu$ l de anticuerpo primario anti-porinas, 5.-anticuerpo anti-porinas de ratón, 7.- porinas de *S. typhi* inmunoprecipitadas con 15  $\mu$ l de anticuerpo primario anti-porinas, 9.- porinas de *S. typhi*, todas las muestras se encuentran en condiciones reducidas. B) Western Blot revelado, todas las muestras se corrieron en PAGE-SDS en condiciones reducidas. Las bandas de los carriles corresponden a 3.- Porinas inmunoprecipitadas de la vacuna con 15  $\mu$ l de anticuerpo primario anti-porinas, 5.- anticuerpo anti-porinas de ratón, 7.- porinas de *S. typhi* inmunoprecipitadas con 15  $\mu$ l de anticuerpo primario anti-porinas, 9.- porinas de *S. typhi*,

Para identificar a las porinas de *S. typhi* en la emulsión de vacuna se realizó una inmunoprecipitación de las mismas utilizando anticuerpos de ratón anti-porinas como anticuerpo primario y proteína G que posee afinidad por unirse a las fracciones Fc de los anticuerpos, unida a una matriz de sefarosa para favorecer la precipitación del complejo. La inmunoprecipitación se realizó con los volúmenes de 15  $\mu$ l de anticuerpo primario p. En el gel teñido con azul de Coomassie se observan en el carril 1 las bandas de proteínas del marcador de peso molecular, en el carril 3 la banda de proteína inmunoprecipitada de la formulación vacunal que posiblemente corresponde a las porinas de *S. typhi* puesto que se encuentra en el peso correspondiente a 35 kDa que coincide con el mismo en el que se observan las bandas de las porinas de *S. typhi* que se inmunoprecipitaron como control positivo de la técnica así como la banda de porinas observada en el carril 9. Además de las bandas correspondientes a las muestras se pueden observar las bandas de proteína que corresponden a las cadenas pesadas

(50 KDa) y ligeras (25 KDa) del anticuerpo anti-porinas empleado para la inmunoprecipitación.

Para confirmar que las bandas de proteínas inmunoprecipitadas corresponden a las porinas de *S. typhi* se realizó una inmunotransferencia en la que empleó un anticuerpo primario de ratón anti-porinas y un anticuerpo secundario anti-ratón IgG1, el revelado mostró la presencia de la banda de porinas inmunoprecipitadas de la formulación vacunal, así como las bandas para el control de porinas inmunoprecipitadas y la banda de porinas de *S.typhi* . Se pueden observar también las bandas correspondientes a las cadenas pesadas ( 50 KDa) y ligeras (25 kDa) del anticuerpo primario que son revelados por el uso de un anticuerpo anti-ratón.

## **9.2 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de *S. typhi* induce protección.**

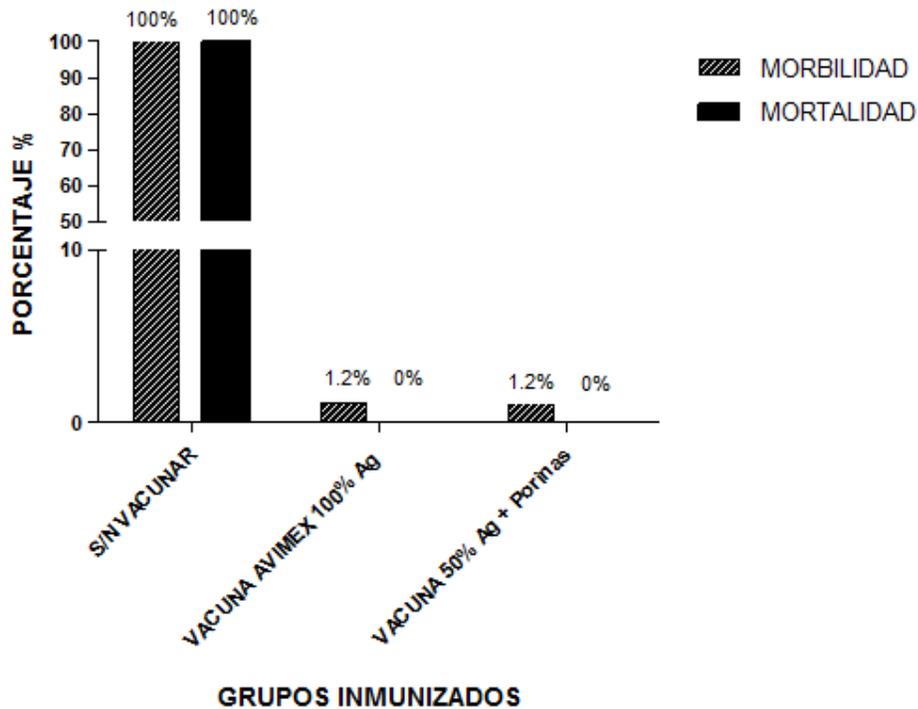
Para evaluar si el uso de las porinas de *S. typhi* como adyuvante de la vacuna contra influenza aviar permite disminuir la dosis de antígeno vacunal, se desarrollo el siguiente esquema de inmunización, grupos de pollos SPF fueron inmunizados con: la vacuna 50 % de antígeno adicionada con 10 µg de las porinas como adyuvante (VACUNA 50% Ag + Porinas); y la vacuna con 100% de antígeno (VACUNA- AVIMEX 100%Ag), como control negativo se inmunizó un grupo de pollos únicamente con 30% de líquido alantoideo. Al día veintiuno posterior a la vacunación se realizó el reto a los diferentes

grupos de pollos con  $10^8$ /mL dosis infectivas de embrión de pollo 50% (DIEP50%) por ave del virus de influenza aviar de alta patogenicidad.

Se encontró que el grupo vacunado con la emulsión VACUNA 50% Ag + Porinas quedó protegido en un 100% para la mortalidad, además del grupo inmunizado con la VACUNA- AVIMEX -100%Ag; en cambio el grupo que recibió placebo presentó muerte de las aves en un 100% en los 10 días posteriores. (Figura 4)

Para evaluar la morbilidad de los diferentes grupos, se evaluó durante los diez días posteriores al reto diariamente los signos clínicos que presentaba cada animal (conjuntivitis, pluma erizada, postramiento y mortalidad), asignando un valor numérico dependiendo la severidad del síntoma presentado de acuerdo a la tabla 3, se determinó el porcentaje de severidad sumando los valores individuales de cada pollo durante los 10 días, el valor más alto se correlacionó con el 100% de morbilidad.

Se encontró que el porcentaje de morbilidad que presentan los grupos es semejante con un valor de 12%, los síntomas presentados correspondieron únicamente a conjuntivitis, pluma erizada y postramiento de algunas aves, el porcentaje obtenido corresponde a un valor menor comparado con el de el grupo sin vacuna, el cual presenta un valor del 100% de morbilidad, donde la severidad de los síntomas presentados derivó hasta la mortalidad de todos los animales. (Figura 4)



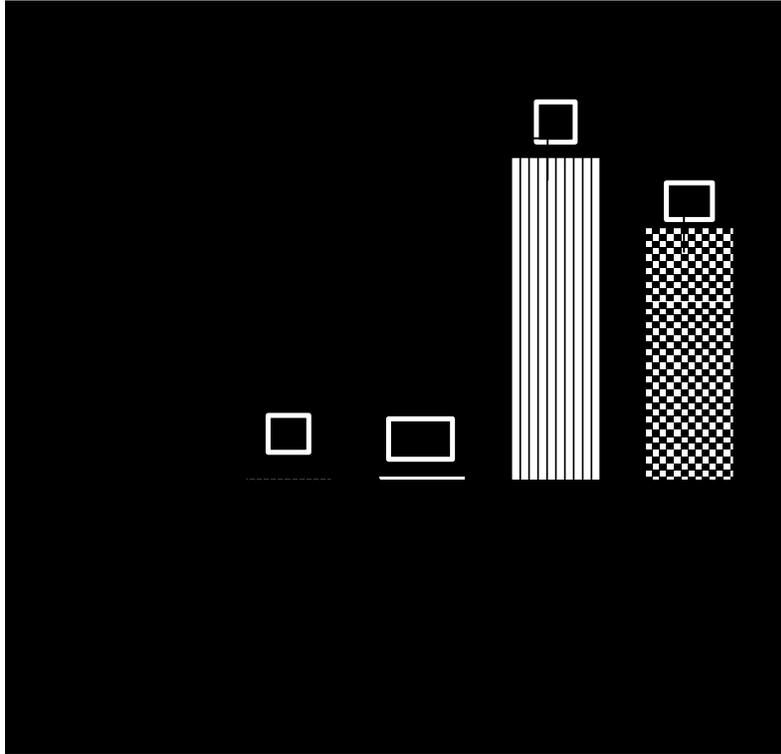
**Figura 4: La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con la mitad de antígeno Ag adyuvantada con las porinas de de *S. typhi* induce 100% de protección.** Grupos de 20 pollos SPF fueron vacunados con la vacuna 50 % de antígeno adicionada con 10 µg de las porinas como adyuvante (VACUNA-50 %Ag + Porinas); y la vacuna con 100% de antígeno y adyuvante (VACUNA AVIMEX 100% Ag); como control negativo se inmunizaron con 30% de líquido alantoideo: Se evaluó la morbilidad (barra gris) y mortalidad (barra negra) de cada uno de los grupos vacunados con las emulsiones después del reto con el virus de influenza aviar de alta patogenicidad usando una dosis de  $10^8$  /ml dosis infectivas de embrión de pollo 50% (DIEP50%) por ave. Se evaluó el porcentaje de muerte durante 10 días y se determinó el índice de morbilidad utilizando una escala de severidad de síntomas y signos.

### **9.3 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de Ag adyuvantada con las porinas de *S. typhi* inducen la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.**

Para conocer si la nueva formulación de vacuna donde se disminuye la dosis de antígeno vacunal si se adicionan las porinas de *S. typhi* como adyuvante, son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, Se tomaron muestras de sangre a los 21 días posteriores a la vacunación del esquema anteriormente mencionado.

Los diferentes sueros fueron analizados mediante ensayos de HI para evaluar la inducción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.

Se encontró que el grupo de pollos inmunizados con la vacuna con 100% de antígeno presenta el mayor valor para el título de anticuerpos inhibidores obtenido; respecto al cual se compararon los títulos obtenidos para cada grupo vacunado, obteniéndose que la emulsión vacunal conjugada con las porinas (VACUNA-50%Ag +Porinas) logra la inducción de un título de anticuerpos alto con un valor de 9 (dilución 1:512) comparado con el máximo valor obtenido por la VACUNA AVIMEX-100% Ag con un valor de 12 (valor de dilución 1:4096). Mientras que el grupo administrado con líquido alantoideo no presenta significancia en su valor de título de anticuerpos.

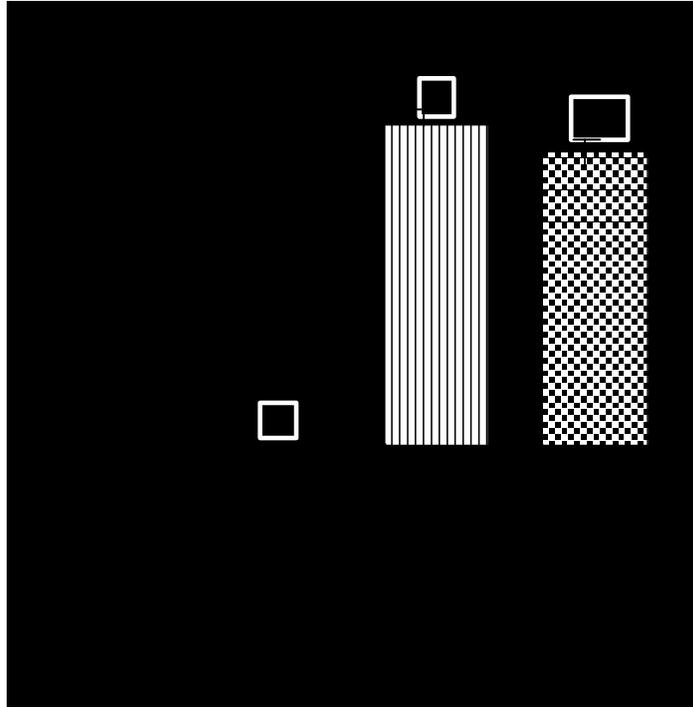


**Figura 5** La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de *S. typhi* inducen la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación. Se evaluó el título de anticuerpos mediante IH en los sueros de los pollos inmunizados con las emulsiones vacunales al día veintiuno. Se muestran los títulos en logaritmo base 2 de cada grupo vacunado, la barra representa los valores máximo y mínimo obtenidos para cada grupo..

#### **9.4 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con la mitad Ag adyuvantada con las porinas de *S. typhi* inducen una respuesta de anticuerpos de memoria.**

Encontramos que la vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de Ag adyuvantada con las porinas de *S. typhi* es capaz de inducir protección (FIGURA ) y una respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (FIGURA 5), sin embargo es importante que las vacunas sean capaces de generar una respuesta de memoria, para evaluar esto los grupos de pollos que sobrevivieron al reto con el VIAAP (segundo encuentro con el antígeno), fueron sangrados 10 días posteriores al reto y se determinó la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación mediante ensayos de HI.

Después de realizados los ensayos se encontró que el grupo vacunado con la emulsión del antígeno VIABP cepa-435y las porinas presentó un incremento en el valor de título obtenido diez días siguientes a la vacunación. Existe un incremento en el valor de título anterior determinado al día veintiuno en el grupo inmunizado con la vacuna adyuvantada con las porinas, el incremento corresponde a un valor de título de 11.4 (valor de dilución 1: 2048) el cual representa un incremento de más de dos títulos en las cantidades de anticuerpo inducido por la vacuna posterior al reto con el antígeno viral comparándolo con el grupo inmunizado con la VACUNA-AVIMEX-100%Ag cuyo valor de título corresponde al más alto obtenido con un valor de 12 (dilución 1:4096)



**FIGURA 6:** El uso de las porinas de *S. typhi* como adyuvante de una vacuna inactivada con 50% Ag del virus de influenza aviar induce una respuesta de anticuerpos de memoria. Se evaluaron los títulos de anticuerpos de los grupos vacunados a los diez días posteriores al reto con el antígeno viral, los títulos se expresan en logaritmo base 2, además de que se muestran los valores máximo y mínimo para cada grupo indicados por las barras.

### **9.5 La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de *S. typhi* no inducen la producción de anticuerpos anti-Salmonella**

La presencia de anticuerpos anti-Salmonella en los pollos es un factor importante para la comercialización de estos, por lo que el uso de una vacuna en pollos adyuvantada con porinas de *Salmonella entérica* serovar Typhi, pudiera existir el riesgo que los pollos generen una respuesta contra estas proteínas que pudieran dar resultados positivos en la prueba que busca anticuerpos anti-*Salmonella typhi*; para evaluar esto, se analizó en los diferentes sueros de los pollos vacunados con las diferentes formulaciones y se determinó la presencia de anticuerpos anti-*Salmonella typhi*, y otras especies de salmonellas como *Salmonella typhimurium* y *Salmonella gallinarum* mediante la técnica de ELISA.

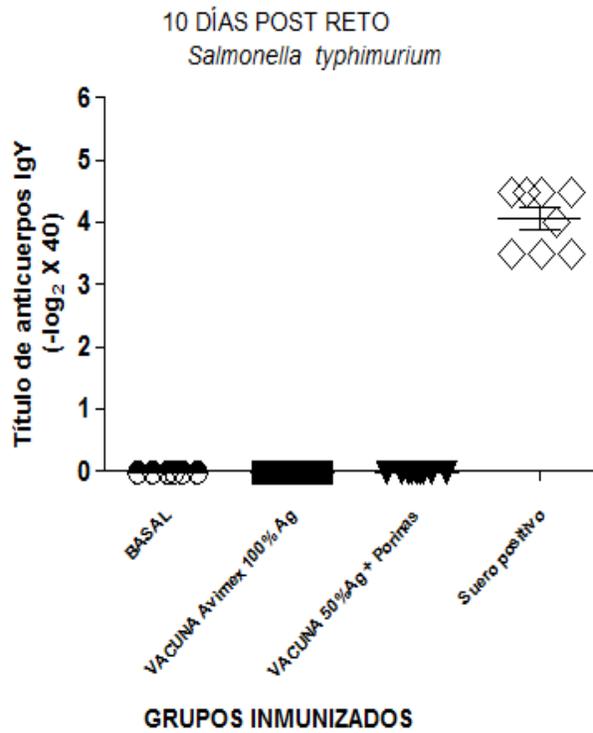
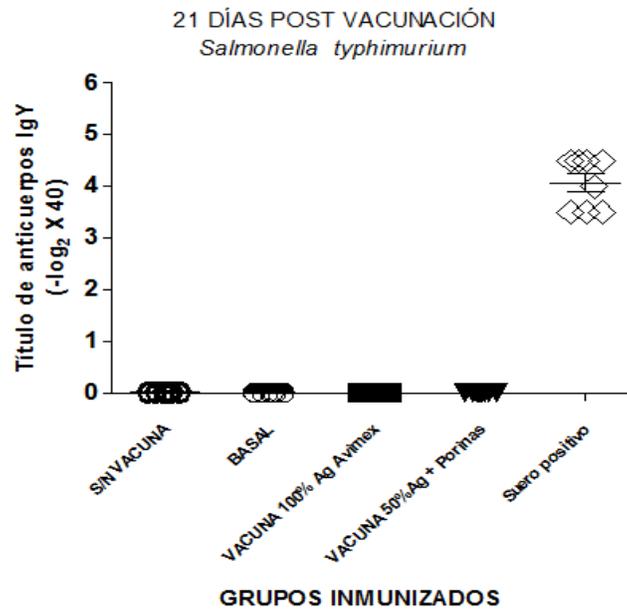
Se encontró que ningún suero obtenido al 21 posterior a la inmunización en los grupos vacunados tuvo la presencia de anticuerpos  $\alpha$ -*Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y para *Salmonella gallinarum* solo se encontró un suero positivo para la presencia de anticuerpos que no corresponde a un resultado significativo estos resultados se compararon con el resultado obtenido en el suero basal.

En los sueros obtenidos diez días posteriores al reto con el VIAAP y analizados por ELISA para la presencia de anticuerpos contra *Salmonella typhi*, se encontró que hay dos sueros en el grupo inmunizado con la Vacuna Avimex 100% Ag así como en el grupo inmunizado con la nueva formulación

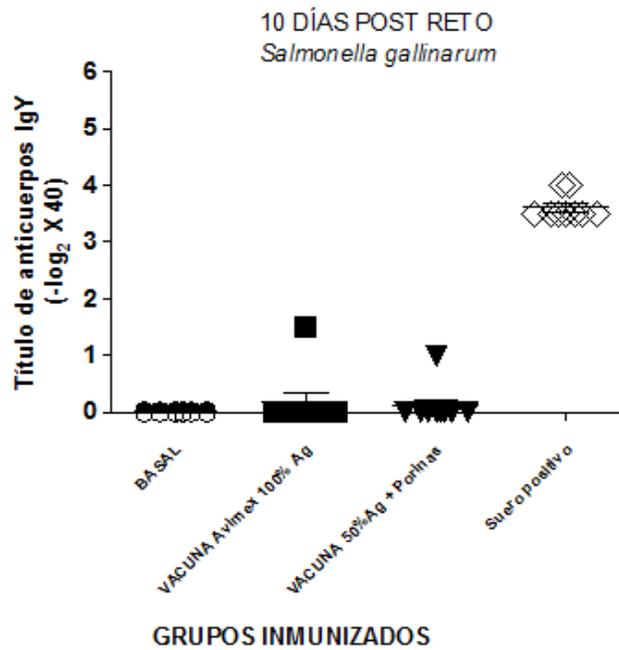
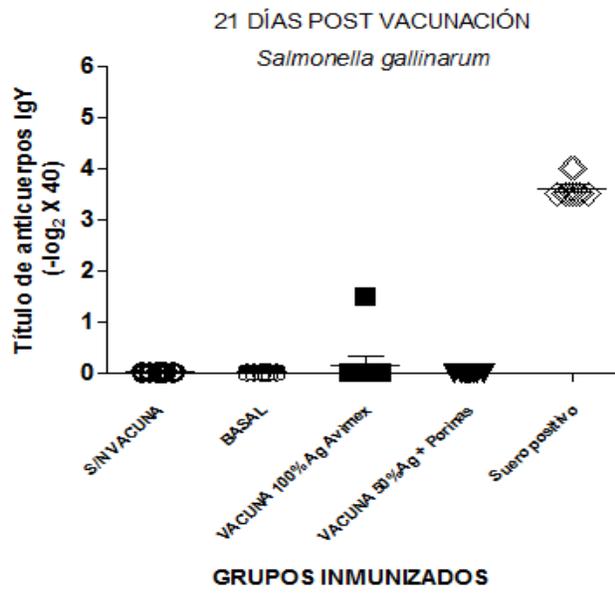
vacunal adyuvantada con las porinas de *S. typhi*. Para la evaluación de la presencia de anticuerpos *anti-Salmonella typhimurium* no se encontró ningún suero positivo para la presencia de anticuerpos, para la evaluación de anticuerpos *anti-Salmonella gallinarum* en los sueros de los pollos vacunados con la vacuna emulsionada con las porinas solo se encontró un suero positivo.



## B) *Salmonella typhimurium*



C) *Salmonella gallinarum*



**FIGURA 7: La vacuna inactivada del virus de influenza aviar con porinas de *Salmonella typhi* como adyuvante no induce títulos de anticuerpos  $\alpha$ -*Salmonella typhi*, *S. typhimurium* y *S. gallinarum*** Se evaluaron los grupos vacunados para detectar la presencia de anticuerpos contra *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella gallinarum*. El título de los anticuerpos se expresa como logaritmo en base 2. A) No se observa título de anticuerpos inducidos contra *S. typhi* en los sueros al día 21 posterior a la inmunización y al día 10 post-reto se observan dos sueros positivos para el grupo VACUNA 100% Ag Avimex y VACUNA 50% Ag+ Porinas. B) Título de anticuerpos inducidos contra *S. typhimurium* en los sueros al día 21 posterior a la inmunización y al día 10 post-reto, ninguno de los grupos presentó sueros positivos. C) Título de anticuerpos inducidos contra *S. gallinarum* en sueros del día 21 posterior a la inmunización solo se encontró un suero positivo para el grupo VACUNA 100% Ag Avimex y al día 10 post-reto un suero positivo en el grupo VACUNA 100% Ag Avimex y VACUNA 50% Ag+ Porinas.

## 10.DISCUSIÓN.

La recurrente aparición de enfermedades, requiere de la aparición y el desarrollo de estrategias como la vacunación que permitan el control de estas, por lo que la búsqueda en el mejoramiento de estas estrategias requiere del estudio de moléculas existentes en la naturaleza que sean capaces de incrementar la respuesta establecida ante la exposición a un antígeno específico, como es el caso de las porinas de *Salmonella typhi* [21, 35]

El objetivo de la vacunación es el establecer una respuesta de memoria de anticuerpos que permita proteger ante la reinfección con el antígeno, y para que se realice el montaje de la respuesta inmunológica es necesaria la activación del sistema inmune de forma eficiente [13] .Previos estudios realizados sobre los efectos de las porinas de *S. typhi* con respecto a la activación del sistema inmune han arrojado que estas proteínas son capaces de incrementar la respuesta de anticuerpos contra un antígeno modelo poco inmunogénico como la OVA y HEL,[29, 31] así como de ser capaces de activar la señalización a través de PRR's como los receptores tipo Tol (TLR's)[29] , componentes requeridos para el establecimiento de la respuesta inmune innata, la cual es necesaria para la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Para poder relacionar los resultados obtenidos con respecto a la capacidad adyuvante de las porinas de *S typhi* se identificaron primero estas en la formulación vacunal administrada a las aves, se encontró que las porinas están presentes en la emulsión y que no sufrieron ninguna alteración estructural durante el proceso de preparación de la emulsión.

Con base en los resultados obtenidos con respecto al uso de las porinas de *S. typhi* como molécula adyuvante en una vacuna contra la influenza aviar, el uso de esta permite conferir protección frente al reto con el antígeno viral ya que no se registró la presencia de mortalidad en el grupo vacunado, observado en la figura 2. Además de esto el empleo de las porinas permiten la activación de la respuesta inmune adaptativa mediante la detección de títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en los sueros evaluados, así como el establecimiento de una respuesta de memoria de anticuerpos puesto que genera un incremento del título de anticuerpos obtenido diez días posteriores al reto realizado y observado en las figuras 3 y 4

Los resultados encontrados permiten conocer que es posible la disminución de la cantidad de antígeno usado en un 50 % con una buena respuesta de la vacuna, esto es importante puesto que la disminución de cantidad de antígeno permitirá reducir los costos en la producción de las vacunas así como el desarrollar un mayor número de dosis incrementándose así la cobertura en la protección de las aves.

Además de los resultados de la eficiente activación de la respuesta inmune debido al uso de las porinas como adyuvante, demás resultados demuestran

que el uso de estas proteínas no inducen la producción de anticuerpos dirigidos contra *S. typhi*, puesto que la presencia de anticuerpos contra esta bacterias es uno de los indicativos de rechazo del control de calidad establecidos en las normas que reglamentan la venta de productos de consumo alimenticio[36-38]. Así mismo se evaluó la reactividad cruzada que podría inducir el uso de las porinas de *S. typhi* con respecto a otras especies de salmonella como *Salmonella typhimurium* y *Salmonella gallinarum*, siendo este agente causal de salmonelosis aviar por lo que la detección de anticuerpos se emplea como medida para el control de enfermedades aviares.[38, 39]. En los resultados obtenidos no se encontró la generación significativa de anticuerpos contra las especies de salmonella, inducidos por el uso de porinas de *Salmonella typhi* como adyuvante.

En conjunto estos resultados junto con los demás estudios previos realizados sobre las propiedades adyuvantes de las porinas permiten apoyar fuertemente el empleo de estas como moléculas adyuvantes que puede ser usadas en el diseño de formulaciones vacunales, representando una destacada opción debido a su capacidad para inducir la activación de la respuesta inmune al ser conjugada con una emulsión vacunal empleando 50% del antígeno viral y no presentar efectos secundarios severos posteriores a su aplicación, en comparación a otras moléculas adyuvantes empleadas de uso comercial. Permitiendo el montaje de una respuesta inmune efectiva y la reducción de la cantidad de antígeno empleado, favoreciendo la producción y cobertura de la vacuna

## 11.CONCLUSIONES.

Las porinas de *Salmonella typhi* como adyuvante de la vacuna de influenza aviar permite disminuir al 50% el antígeno vacunal e inducir protección.

La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de *S. typhi* induce la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación.

La vacuna de virus de influenza aviar inactivada con 50% de antígeno adyuvantada con las porinas de *S. typhi* no induce anticuerpos anti-*Salmonella typhi*.

## 12.ANEXO

### **Elaboración de vacunas inactivadas con y sin porinas:**

El porcentaje de inclusión de antígeno (Ag) de VIA en las vacunas convencionales emulsionadas e inactivadas Se realizó de acuerdo a la DIEP50% contenida en el fluido vacunal antes de su inactivación usando un volumen normalmente empleado para la elaboración de estas vacunas, en el caso de la vacuna AVIMEX 100% Ag y de ½ volumen para la vacuna 50% Ag + Porinas, esta última conteniendo 10 microgramos de porinas en 0.5 ml de la emulsión final.

Las emulsiones placebo (E. Placebo) se elaboraron con 30% de fluido alantoideo de embriones de pollo normales tratado con el mismo inactivante.

Para las vacunas inactivadas la adición de porinas se hizo en la fase acuosa con el Ag correspondiente antes de la emulsificación con aceites minerales . Se elaboró 1 litro de cada una ya que es la mínima cantidad de vacuna que se puede trabajar en el emulsificador de Mejora y Nuevos Productos (MNP), por lo que se requirieron 20 miligramos de porinas. *(Modificado de Protocolo IA-1012, propiedad de AVIMEX. S.A. de C.V.)*[40]

## **Reactivos utilizados para los ensayos de inhibición de la hemaglutinación.**

### **- Solución 0.5% de ckRBC.**

Se toman 500µl de una solución 5% de eritrocitos de pollo y diluyen en 100 ml.

### **- Preparación de la solución del VIABP**

Titulación del antígeno

- Colocar 25 µl de diluyente para el antígeno en cada uno de los 12 pozos en 2 filas de una microplaca de poliestireno con pozos de fondo en forma de “V”
- Agregar 25 µl de antígeno en el primer pozo de cada fila.
- Utilizando micropipeta de 25 µl, hacer diluciones logarítmicas base 2 seriadas de 1:2 a 1:1024 del antígeno, dejando los dos últimos pozos de cada fila sin antígeno para que sirvan como control de eritrocitos.
- Agregar otros 25 µl de PBS en cada pozo.
- Agregar 25 µl de la suspensión de eritrocitos de pollo al 1% en PBS a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.
- Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Realizar la lectura hasta que se forme un botón bien delimitado en el fondo de los pozos para control de eritrocitos.

**Interpretación de la titulación del antígeno:** El punto final de la titulación de antígeno es la dilución más alta del antígeno en la que se observe el

100% de hemaglutinación. Se considera que en esta dilución existe una unidad hemaglutinante (UHA). La dilución conteniendo las UHA deseadas del antígeno, se determina dividiendo el punto final de la hemaglutinación entre 4 para obtener 4 UHA en 25 µl de suspensión del antígeno.

(tomado de la NOM-044-ZOO-1995)

### **Reactivos utilizados para las determinaciones por ELISA.**

#### **- Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.4**

Pesar exactamente:

Cloruro de sodio 8.7 g

Fosfatos monobásico de sodio 0.7 g

Fosfato dibásico de sodio 2.7 g

Disolver en 500mL de agua destilada, ajustar el pH y llevar a un volumen de 100mL con agua destilada

#### **- Solución amortiguadora de citratos (SBC) pH 5.6**

Ácido cítrico 4.1g

Citrato de sodio 29.0g

Disolver en 500mL de agua destilada, ajustar pH y aforar con agua destilada a 1000mL.

- **Solución amortiguadora de carbonatos (SAC) pH 9.5**

Bicarbonato de sodio 7.0g

Carbonato de sodio 2.8g

Disolver en 500mL de agua destilada, ajustar el pH y llevar a volumen de 1000mL con agua destilada.

- **Solución de bloqueo (PBS + leche al 5%)**

Pesar 5g de leche descremada en polvo, agregar PBS suficiente para hacer un volumen de 100mL.

Esta solución debe ser utilizada el mismo día en que es preparada.

Disolver en 1000mL de agua, ajustar el pH a 7.4

- **Solución de lavado( Agua-Tween 20 0.1%)**

A cada litro de agua agregar 1 mL de Tween 20 y disolver.

- **Solución de revelado**

Por cada 12 mL de SBC agregar 0.006 g de OPD (SIGMA) y 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%( SIGMA)

Nota: Esta solución debe utilizarse inmediatamente después de haberse preparado y debe mantenerse protegida de la luz.

- **Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N**

Medir 6.66 mL de ácido sulfúrico (pureza 98%, δ 1.84) y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL con 50 mL de agua destilada, dejar enfriar y llevar al aforo con agua destilada.

– **Soluciones para la inmunoprecipitación**

Buffer base

TRIS-HCl: 1.575 g (10mM)

EDTA: 0.372 g (1mM)

NaCl: 8.775 g (150mM)

Disolver en 500mL ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1L

.

Buffer de lavado

Buffer base+ 0.1% Triton X 100

### 13.REFERENCIAS

1. NM Bouvier, P Palese: **The biology of influenza viruses.** *Vaccine* 2008, **26 Suppl 4**:D49-53.
2. R Salomon, RG Webster: **The influenza virus enigma.** *Cell* 2009, **136**:402-10.
3. B Wu, C Wang, G Dong, Y Guo, DL Nolte, TJ Deliberto, J Xu, M Duan, H He: **New evidence suggests Southern China as a common source of multiple clusters of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus.** *J Infect Dis* 2010, **202**:452-8.
4. I Kiss, A Balint, G Metreveli, E Emmoth, F Widen, S Belak, P Wallgren: **Swine influenza viruses isolated in 1983, 2002 and 2009 in Sweden exemplify different lineages.** *Acta Vet Scand* 2010, **52**:65.
5. AJ Pereda, M Uhart, AA Perez, ME Zaccagnini, L La Sala, J Decarre, A Goijman, L Solari, R Suarez, MI Craig, et al: **Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America.** *Virology* 2008, **378**:363-70.
6. DC Lee, CK Mok, AH Law, M Peiris, AS Lau: **Differential replication of avian influenza H9N2 viruses in human alveolar epithelial A549 cells.** *Virology* 2010, **7**:71.
7. MI Salazar, O Lopez-Ortega, G Leon-Avila, JE Ramirez-Gonzalez, ME Castro-Mussot: **[The origin of the genetic variability of influenza viruses].** *Gac Med Mex* 2010, **146**:199-206.
8. DC Lye, DH Nguyen, S Giriputro, T Anekthananon, H Eraksoy, PA Tambyah: **Practical management of avian influenza in humans.** *Singapore Med J* 2006, **47**:471-5.
9. G Neumann, T Noda, Y Kawaoka: **Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.** *Nature* 2009, **459**:931-9.
10. JE Kohlmeier, DL Woodland: **Immunity to respiratory viruses.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:61-82.
11. BN Lambrecht, M Kool, MA Willart, H Hammad: **Mechanism of action of clinically approved adjuvants.** *Curr Opin Immunol* 2009, **21**:23-9.
12. RM Zinkernagel, H Hengartner: **On immunity against infections and vaccines: credo 2004.** *Scand J Immunol* 2004, **60**:9-13.
13. H Li, S Nookala, F Re: **Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release.** *J Immunol* 2007, **178**:5271-6.
14. J Gaiger: **The Philosophy and Politics of Abstract Expressionism.** *British Journal of Aesthetics* 2001, **41**:455-457.
15. H Nikaido: **Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein.** *Methods Enzymol* 1983, **97**:85-100.
16. B Lugtenberg, L Van Alphen: **Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 1983, **737**:51-115.

17. H Nikaido: **Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes.** *J Biol Chem* 1994, **269**:3905-8.
18. H Nikaido, M Vaara: **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.** *Microbiol Rev* 1985, **49**:1-32.
19. M Fernandez-Mora, R Oropeza, JL Puente, E Calva: **Isolation and characterization of ompS1, a novel Salmonella typhi outer membrane protein-encoding gene.** *Gene* 1995, **158**:67-72.
20. M Fernandez-Mora, JL Puente, E Calva: **OmpR and LeuO positively regulate the Salmonella enterica serovar Typhi ompS2 porin gene.** *J Bacteriol* 2004, **186**:2909-20.
21. I Secundino, C Lopez-Macias, L Cervantes-Barragan, C Gil-Cruz, N Rios-Sarabia, R Pastelin-Palacios, MA Villasis-Keever, I Becker, JL Puente, E Calva, et al: **Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response.** *Immunology* 2006, **117**:59-70.
22. A Arockiasamy, S Krishnaswamy: **Crystallization of the immunodominant outer membrane protein OmpC; the first protein crystals from Salmonella typhi, a human pathogen.** *FEBS Lett* 1999, **453**:380-2.
23. A Basle, G Rummel, P Storici, JP Rosenbusch, T Schirmer: **Crystal structure of osmoporin OmpC from E. coli at 2.0 Å.** *J Mol Biol* 2006, **362**:933-42.
24. L Cervantes-Barragan, C Gil-Cruz, R Pastelin-Palacios, KS Lang, A Isibasi, B Ludewig, C Lopez-Macias: **TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens.** *Eur J Immunol* 2009, **39**:126-35.
25. A Isibasi, V Ortiz-Navarrete, J Paniagua, R Pelayo, CR Gonzalez, JA Garcia, J Kumate: **Active protection of mice against Salmonella typhi by immunization with strain-specific porins.** *Vaccine* 1992, **10**:811-3.
26. CR Gonzalez, A Isibasi, V Ortiz-Navarrete, J Paniagua, JA Garcia, F Blanco, J Kumate: **Lymphocytic proliferative response to outer-membrane proteins isolated from Salmonella.** *Microbiol Immunol* 1993, **37**:793-9.
27. PC Fusco, F Michon, JY Tai, MS Blake: **Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates.** *J Infect Dis* 1997, **175**:364-72.
28. GH Lowell, WR Ballou, LF Smith, RA Wirtz, WD Zollinger, WT Hockmeyer: **Proteosome-lipopeptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides.** *Science* 1988, **240**:800-2.
29. C Gil-Cruz: **Evaluación de la respuesta inmune innata inducida por las porinas de Salmonella enterica serovar Typhi.** Instituto Politécnico Nacional. Ref Type: Thesis/Dissertation. 2006.
30. P Massari, P Henneke, Y Ho, E Latz, DT Golenbock, LM Wetzler: **Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent.** *J Immunol* 2002, **168**:1533-7.
31. LM Wetzler: **Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity.** *Future Microbiol* 2010, **5**:749-58.

32. R Cottey, CA Rowe, BS Bender: **Influenza virus**. *Curr Protoc Immunol* 2001, **Chapter 19**:Unit 19 11.
33. CCG Trinidad.: **Estudio de la seroprevalencia contra el virus de la influenza pandémica a (h1n1)2009 en mujeres gestantes.. Instituto Politécnico Nacional. Ref Type: Thesis/Dissertation.** 2009.
34. H Namuth: **Jackson Pollock**. In. City; 1951: 10 minutes.
35. S Giriputro, R Agus, S Sulastri, D Murniati, F Darwis, IB Wiweka, A Rusli, S Sirait, S Marhaningtyas, T Hendrawardati, et al: **Clinical and epidemiological features of patients with confirmed avian influenza presenting to Sulianti Saroso Infectious Diseases Hospital, Indonesia, 2005-2007**. *Ann Acad Med Singapore* 2008, **37**:454-7.
36. **NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.** 2002.
37. E Kelly, J O'Hagan: **Geographic clustering of economic activity: The case of prominent western visual artists**. In; 2006; Vienna, Austria. 109-128.
38. S Harris: **The Gaulish and the feudal as lieux de memoire in post-war French abstraction**. *Journal of European Studies* 2005, **35**:201-220.
39. R Motherwell, A Reinhardt (eds.): **Modern Artists in America**. New York, New York: Wittenborn Schultz; 1952.
40. Avimex: **Protocolo IA-1012, propiedad de AVIMEX. S.A. de C.V.)**.. In. City; 2010.