



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL PROPÓLEO EN UNA BACTERINA**  
**CONTRA *Pasteurella multocida* EN CONEJOS**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**IONNA ALEJANDRA FERNÁNDEZ GÁMEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA, CU**  
**HUGO ÁLVAREZ RAMÍREZ**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, JUNIO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Dedicatorias

*Incluso los que dicen que no puedes hacer nada para cambiar tu destino, miran al cruzar la calle. Stephen Hawking.*

A mi familia y amigos les dedico esta tesis terminada en restitución de la atención que por ella les he robado.

En agradecimiento a los animales de laboratorio que tuvieron que dar su vida para la obtención de resultados.

## Agradecimiento

El presente proyecto ofrece su agradecimiento en el proceso de colaboración y revisión. Todas las presentes áreas se encuentran dentro de las inmediaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Campo 4 y 1, UNAM.

Área	Responsable	Apoyo
<b>Módulo de apicultura. Rancho Almaraz.</b>	M. en A. Liborio Carrillo Miranda.	Proceso de recolección del propóleo en greña.
<b>Módulo de cunicultura. Rancho Almaraz.</b>	M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández.	Recolección de muestras de secreciones mucopurulentas para el aislamiento bacteriano y entrega de los conejos experimentales.
<b>Laboratorio de bacteriología, Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia.</b>	MVZ Marco Mendoza.	Identificación bioquímica de la cepa de <i>Pasteurella multocida</i> utilizada.
<b>Laboratorio 17, UIM.</b>	Dra. Alma Núñez.	
<b>Laboratorio de histología, LIC. Medicina Veterinaria y Zootecnia.</b>	Dr. Germán Garrido Fariña	Preparación de las muestras histopatológicas.
<b>Bioterio, Unidad de Investigación Multidisciplinaria.</b>	FESC	Refugio de los conejos experimentales.
<b>Laboratorio 4, Unidad de Investigación Multidisciplinaria.</b>	Dr. Carlos García Tovar. MVZ José Nieto Bordes.	Elaboración de los extractos bacterianos, cuantificación de proteínas, prueba de inmunohistoquímica, elaboración y semiestandarización de la técnica de ELISA utilizada.
<b>Laboratorio inmunología, campo-1</b>	Dra. Gabriela Bárcenas. cDra. Marcela Autrán.	Asesoría en el proceso de elaboración y semiestandarización de la técnica de ELISA utilizada.
<b>Laboratorio Virología, Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia.</b>	Dr. Hugo Álvarez Ramírez.	
<b>FESC - Campo 1</b>	Dra. Alma Lara	Asesoría en el análisis estadístico de los resultados
<b>CONACYT</b>	CV 829429.	Beca proporcionada para manutención.
<b>COMECYT</b>	Fol. 19BTM0074	Beca de titulación del Edo. México

## **Financiamiento.**

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT 2009-15) titulado *“Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, el distemper canino y la otitis canina”*.

Programa de Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI – 1632): titulado *“Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleos para su aplicación en la salud animal”*.

Programa de Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI – 1829): titulado *“Biología celular y molecular de procesos fisiológicos y de respuesta a infecciones de interés veterinario”*.

índice

I. Resumen.....	8
II. Lista de figuras. ....	10
III. Lista de cuadros. ....	11
1. Marco teórico.....	12
1.1 Propóleo.....	13
1.2 Principales compuestos bioquímicos del propóleo.....	13
1.2.1 Compuestos fenólicos.....	14
1.2.2 Compuestos flavonoides.....	14
1.3 Cunicultura en México.....	15
1.4 Pasteurelisis en el conejo.....	16
1.4.1 Signos clínicos y lesiones.....	17
1.4.2 Diagnóstico.....	17
1.4.3 Tratamiento y prevención de la pasteurelisis.....	18
1.4.4 <i>Pasteurella multocida</i> .....	18
1.4.4.1 Factores de virulencia de <i>Pasteurella multocida</i> .....	19
1.4.5 Respuesta inmunológica contra bacterias extracelulares.....	21
1.4.6 Mastocitos.....	22
1.5 Inmunización.....	23
1.5.1 Adyuvante.....	23
1.5.2 Estimulación de la respuesta inmune adaptativa por las sales de aluminio... ..	24
1.5.3 Actividad inmunoestimuladora del propóleo.....	27
1.5.3.1 Acción de propóleos sobre los linfocitos y producción de anticuerpos.....	28
1.6 Antecedentes del uso del propóleo en conejos.....	28
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	31
4.1 Objetivo general:.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
Fase 1. Formulación de la bacterina.....	31
Fase 2. Evaluación del efecto del propóleo.....	31
5. Metodología.....	32
5.1 Diseño experimental.....	33
5.2 Fase 1. Formulación de la bacterina.....	36
5.2.1 Recolección de propóleo.....	37
5.2.2 Obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP).....	37
5.2.3 Obtención del extracto acuoso de propóleo (EAP).....	38
5.2.4 Análisis químico del EAP.....	38
5.2.4.1 Cuantificación de flavonoides.....	38

5.2.4.2	Cuantificación de compuestos fenólicos del EAP por el método de Folin-Ciocalteu .....	38
5.2.5	Elaboración del adyuvante a base del EAP .....	39
5.2.6	Aislamiento de la cepa de <i>Pasteurella multocida</i> .....	39
5.2.6.1	Identificación bacteriana .....	39
5.2.7	Formulación de la bacterina.....	39
5.2.7.1	Extracto bacteriano.....	40
5.2.7.2	Bacterina con adyuvante a base de hidróxido de aluminio Al(OH) <sub>3</sub> .....	40
5.2.7.3	Bacterina con adyuvante a base de EAP .....	40
5.3	Fase 2. Evaluación del propóleo .....	41
5.3.1	Modelos biológicos experimentales .....	42
5.3.2	Procedimiento de inoculación .....	42
5.3.3	Desafío .....	43
5.3.3.1	Potencialización de la cepa virulenta de <i>Pasteurella multocida</i> .....	43
5.3.3.2	Elaboración del inóculo de <i>Pasteurella multocida</i> virulenta.....	44
5.3.4	Niveles de anticuerpos.....	44
5.3.4.1	Extracto bacteriano .....	44
5.3.4.2	Rompimiento bacteriano .....	45
5.3.5	Sacrificio y necropsia de los animales experimentales.....	45
5.3.6	Ganancia de peso.....	45
5.3.7	Lesión pulmonar macroscópica .....	45
5.3.8	Estudio histopatológico.....	46
5.3.8.1	Conteo de mastocitos.....	46
5.3.9	Tomas radiográficas.....	46
5.3.10.	Análisis estadístico de resultados .....	46
5.3.10.1	Modelo de regresión lineal múltiple .....	47
6.	Resultados .....	48
6.1	Fase 1. Formulación de la bacterina .....	49
6.1.1	Recolección del propóleo en greña .....	50
6.1.2	Análisis químico del propóleo .....	50
6.1.2.1	Cuantificación de flavonoides .....	50
6.1.2.2	Cuantificación de fenoles.....	51
6.1.3	Cepa de <i>Pasteurella multocida</i> tipo A.....	52
6.2	Fase 2. Evaluación del propóleo .....	53
6.2.1	Modelos biológicos experimentales .....	54
6.2.2	Procedimiento de inoculación .....	54
6.2.3	Desafío .....	55
6.2.5	Niveles de anticuerpos .....	56
6.2.5.1.1	Rompimiento bacteriano .....	57

6.2.7 Sacrificio y necropsia de los animales experimentales .....	59
6.2.10 Evaluación de las radiografías .....	62
6. 2.11 Análisis estadístico de resultados .....	64
6.2.12 Modelo de regresión lineal múltiple .....	64
7. Discusión .....	68
8. Conclusiones .....	76
9. Prospectivas .....	78
10. Anexos.....	79
Protocolos.....	80
1. Procedimiento de la prueba de descapsulación por hialuronidasa .....	80
2. Técnica de inmunohistoquímica y fluorescencia directa .....	80
3. Procedimiento del método micro Bradford .....	81
4. Técnica de ELISA indirecta .....	81
5. Inclusión rápida de Robinson y Fayen .....	82
6. Tinción de hematoxilina eosina (HE) .....	82
7. Tinción de azul de toluidina (AT).....	83
Soluciones .....	83
1. Preparación del revelador de ELISA .....	83
2. Solución sustrato de ELISA .....	83
Gráficos .....	84
1. Fig. 19. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental para los grupos de propóleo.....	84
2. Fig. 20. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental .....	85
Aceptación del protocolo experimental por CICUAE - FESC .....	86
11. Referencias .....	87

## I. Resumen

Los compuestos flavonoides del propóleo participan en la activación del sistema inmunológico induciendo la liberación de citocinas, de linfocitos y macrófagos, lo que lleva a un aumento de la inmunidad específica celular y humoral. La bacteria *P. multocida* es la causante del snuffles en conejos, la cual tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad en animales dedicados a la producción. Por lo anterior, el **objetivo** del presente trabajo fue demostrar el efecto inmunoestimulante del propóleo utilizado como adyuvante en una bacterina contra *P. multocida* en conejos. Las bacterinas fueron inoculadas en 24 conejos experimentales, en tres ocasiones con intervalos de 15 días cada una. El efecto inmunoestimulante fue comparado entre 2 propóleos de diferente origen y relacionado con el hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). El efecto inmunoestimulante se estableció por medio de la determinación de niveles de anticuerpos IgG séricos en muestras séricas obtenidas previamente a las inmunizaciones y con intervalos de 14 días. Se estableció el daño pulmonar macroscópico por medio de placas de tórax y un análisis digital de imagen. El daño pulmonar microscópico (de muestras de corazón, hígado y riñón) se determinó por tinción de hematoxilina y eosina (HE) y un conteo de mastocitos utilizando una tinción de azul de Toluidina (AT) en muestras histopatológicas de pulmón. En **conclusión**, los resultados obtenidos son indicativos de un efecto equiparable al hidróxido de aluminio, por parte del propóleo mexicano y sugieren una correlación existente entre la concentración de compuestos flavonoides y el efecto inmunoestimulante obtenido (con un aumento de los niveles de anticuerpos entre 6.02 – 7.34 de densidad óptica (OD)). Además, se demuestra una correlación entre el daño pulmonar macroscópico y el conteo de mastocitos en muestras histopatológicas, en donde el daño macroscópico aumento entre 1.3 – 5.0% con respecto al aumento del conteo de mastocitos.

**Palabras clave:** *Pasteurella multocida*; propóleo; adyuvante, flavonoide.

## **Abstract.**

The flavonoid compounds of propolis participate in the activation of the immune system by inducing the release of cytokines, lymphocytes, and macrophages, which leads to an increase in specific cellular and humoral immunity. The *P. multocida* bacteria is the cause of snuffles in rabbits, which has a high morbidity and mortality rate in animals dedicated to production. Therefore, the objective of this work was to demonstrate the immunostimulatory effect of propolis used as an adjuvant in a bacterium against *P. multocida* in rabbits. The immunostimulatory effect was compared between 2 propolis of different origin in related to aluminum hydroxide (Al (OH)<sub>3</sub>). The immunostimulatory effect was established through the determination of serum IgG antibody levels in serum samples obtained before immunizations and at intervals of 14 days. Microscopic lung damage (from heart, liver and kidney samples) was determined by staining with hematoxylin and eosin (HE), the mast cell count using toluidine blue (TA) staining in histopathological lung samples. In conclusion, the results obtained are indicative of an effect comparable to aluminum hydroxide, by Mexican propolis and suggest a correlation between the concentration of flavonoid compounds and the immunostimulant effect obtained (with an increase in antibody levels between 6.02 - 7.34 optical density (OD)). Also, a correlation between macroscopic lung damage and number of mast cell in histopathological samples is demonstrated, where the macroscopic damage increased between 1.3 - 5.0% with respect to the increase in the number of the mast cell.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*; flavonoid; serum antibody, Mexican propolis.

## II. Lista de Figuras.

Fig. 1 Características estructurales de los principales tipos de flavonoides.

Fig. 2 Coriza en una coneja adulta.

Fig. 3. Factores de virulencia de *P. multocida*.

Fig. 4. Modelo simplificado de la activación de respuesta inmune contra un microorganismo.

Fig. 5. Activación del inflammasoma NLRP3 por sales de aluminio.

Fig. 6. Estimulación de la respuesta inmune adaptativa por las sales de aluminio.

Fig. 7. Propóleo en greña.

Fig. 8. Animal clínicamente enfermo.

Fig. 9. Lesiones observadas a la necropsia en el segundo ratón inoculado para aislar *P. multocida*.

Fig. 10. Lesiones observadas a la necropsia en el tercer ratón inoculado para aislar *P. multocida*.

Fig. 11. Determinación de los niveles de anticuerpos en los conejos inmunizados con los diferentes adyuvantes. Técnica de ELISA indirecta.

Fig.12. Determinación de la presencia del rompimiento bacteriano. Técnica de inmunohistoquímica indirecta.

Fig.13 Muestra del extracto bacteriano de *P. multocida*. Técnica de fluorescencia directa con DAPI para marcar ADN.

Fig. 14. Ganancia de peso promedio por grupo experimental.

Fig. 15. Porcentaje promedio del daño pulmonar macroscópico.

Fig. 16. Conteo promedio de mastocitos por grupo experimental.

Fig. 17. Presencia de mastocitos en pulmones de conejos, del grupo control.

Fig. 18. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental, para los grupos de propóleo.

Fig. 19. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental, para todos los grupos inmunizados.

Fig. 20. Correlación entre el conteo de mastocitos y el porcentaje de daño macroscópico pulmonar.

Fig. 21. Correlación entre la concentración de flavonoides (%) y los niveles de anticuerpos al día 56 experimental (OD).

### **III. Lista de Cuadros.**

Cuadro 1. Determinación de la absorbancia por dilución de propóleo.

Cuadro 2. Porcentaje de flavonoides por concentración de propóleo.

Cuadro 3. Porcentaje aproximado de compuestos flavonoides.

Cuadro 4. Porcentaje de fenoles por concentración de propóleo.

Cuadro 5. Porcentaje aproximado de compuestos fenólicos totales.

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas primarias y secundarias de la identificación bacteriana.

Cuadro 7. Fotografías representativas de las 24 h posteriores, a cada una de las inmunizaciones de cada grupo experimental.

Cuadro 8. Ganancia de peso promedio por grupo experimental.

Cuadro 9. Representación cualitativa del daño histopatológico observado en muestras de corazón, hígado y riñón por grupo experimental

Cuadro 10. Lesiones macroscópicas representativas por grupo experimental con su toma radiográfica correspondiente para cada animal experimental.

# 1. MARCO TEÓRICO

---

# **“Efecto inmunomodulador del propóleo en una bacterina contra *Pasteurella multocida* en conejos”**

## **1.1 Propóleo**

La palabra propóleo tiene su origen del griego *propolis* que significa “*pro*”: para o en defensa; y “*polis*”: ciudad, es decir “*Defensa de la colmena*” (Salatino et al., 2005; Miguel y Antunes, 2011). El propóleo es un material resinoso recolectado por las abejas de la yema y exudados de las plantas, que es transformado en presencia de las enzimas contenidas en la cavidad oral de las abejas, su color varía de verde, rojo a marrón oscuro dependiendo de la vegetación y estación del año.

La utilidad del propóleo en medicina veterinaria en un principio se limitaba a su acción antimicrobiana, sin embargo, su uso se ha diversificado, algunos ejemplos son: en ganado lechero, se ha utilizado como linimento para controlar las mastitis, en explotaciones porcícolas se ha empleado como profiláctico en enfermedades respiratorias y gastroentéricas, también se ha utilizado como estimulante para el crecimiento de corderos, cerdos, becerros y en la carpa común. Además de ser utilizado como profiláctico para contrarrestar la fiebre tifoidea en patos, sanar heridas y como anestésico local en cirugía (Lazzari et al., 2011; Bogdanov, 2014), su empleo se ha extendido dentro de la medicina humana en investigaciones sobre el manejo de procesos inflamatorios agudos y crónicos, como es el caso de la artritis (Franchin y Colón, 2016).

## **1.2 Principales compuestos bioquímicos del propóleo**

El propóleo en la naturaleza está compuesto de 30% de cera, 50% resina y bálsamo vegetal, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y otras sustancias (Burdock, 1998). Cuenta con una composición química determinada por una mezcla de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen, destacándose la presencia de compuestos bioactivos tales como ácido cinámico, compuestos fenólicos y flavonoides (Ghisalberti, 1979), terpenos, ácidos aromáticos, derivados del ácido caféico, ácidos grasos y aminoácidos (Bankova et al., 2000).

Las actividades biológicas, para este producto natural, incluyen actividad hepatoprotectora (Bankova et al., 2000), antitumoral (Miguel y Antunes, 2011), inmunomoduladora (Fan et al., 2014), regenerativa, cicatrizante, anestésica (Ghisalberti, 1979), antioxidante y antimicrobiana (Aga, 1994).

El propóleo posee una actividad antimicrobiana, relacionada con la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (Marcucci, 1995), la cual se ha demostrado en experimentos *in vitro* en diferentes tipos de bacterias Grampositivas y algunas Gramnegativas, también frente a hongos filamentosos (Burdock, 1998) y levaduras (Martins et al., 2002).

Bankova et al. (2000) reportaron que la diferente composición química de los propóleos de diferente origen es proporcional a propiedades biológicas disímiles. Así mismo, basado en diversos informes, afirma que los compuestos bioactivos son diversos, por ejemplo, la actividad de defensa para las abejas contra las infecciones bacterianas y fúngicas se deben principalmente a flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres en el caso del propóleo europeo, en comparación con los propóleos brasileños, en donde las propiedades biológicas son atribuidas a los ácidos p-cumáricos y diterpenos.

### 1.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un núcleo aromático unido a un grupo hidroxilo, que incluyen al fenol, los fenoles di y trihídricos, los ácidos hidrobenczoicos, nitrofenoles, clorofenoles, aminofenoles, metoxifenoles, fenoxifenoles, alquilfenoles, derivados de núcleos aromáticos condensados (naftoles). Las propiedades de cada uno de estos compuestos químicos dependerán de la naturaleza de los grupos substituidos en su anillo bencénico (Torres y Calva, 2002).

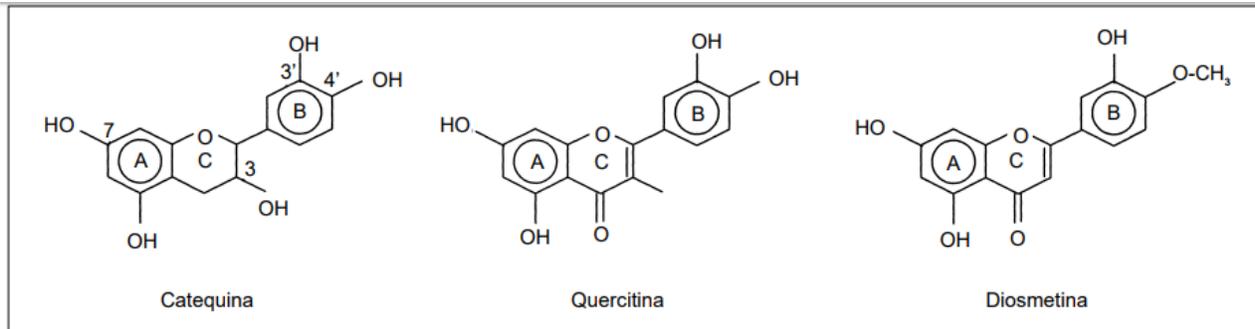
### 1.2.2 Compuestos flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales de bajo peso molecular que comparten una estructura común de difenilpiranos (C6-C3-C6), se componen de dos anillos de fenilos (A y B) ligados por un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 2' al 6' (Martínez-Flores et al., 2002).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: 1) Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C; 2) Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C; 3) Flavonas, como la diosmetina y pinocembrina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3; 4) Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH

en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Fig. 1).

Fig. 1. Características estructurales de los principales tipos de flavonoides. Tomado de Martínez (2002).



Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, cuentan con propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en diversas patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Franchin y Colón, 2016). Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilos y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma) (Martínez-Flores et al., 2002).

### 1.3 Cunicultura en México

La cunicultura es la cría de conejos para el aprovechamiento de su carne y sus productos. El concepto procede del vocablo latino *cuniculus* (“conejo”) y de *cultura* (“que se asocia al cultivo de algo”), se conoce como conejo común al *Oryctolagus cuniculus*, un mamífero de la familia de los lepóridos.

El Estado de México es uno de los principales productores de carne de conejo, en el ciclo 2017 se contaba con aproximadamente de 100,364 vientres, obteniendo una producción de 486.367 toneladas de carne de conejo. Los principales municipios productores de carne de conejo son: Amecameca, Texcoco, la zona del Valle de México, Toluca, Jilotepec y Atlacomulco. A nivel internacional, México ocupa el décimo octavo lugar en su producción con 4 mil 500 toneladas anuales. (SAGARPA, 2018).

La Asociación de Cunicultores del Centro de México (ANCUM) tiene registradas 1,306 unidades de producción como socios en 21 entidades de la República: Oaxaca, Estado de México, Ciudad de México, Puebla, Hidalgo, Chiapas, Querétaro, Jalisco, Michoacán, Sinaloa, Aguascalientes, Veracruz, Yucatán, Colima, Coahuila, Chihuahua, Tamaulipas, Zacatecas, Tlaxcala y Morelos. (ACUM, 2016).

Dentro de la cunicultura, uno de los principales problemas son las enfermedades infecciosas respiratorias agudas, que son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en animales dedicados a la producción, repercutiendo con pérdidas económicas importantes (Cervantes y Aguilar, 2016; Massacci et al., 2018). En México, la prevalencia de lesiones neumónicas macroscópicas de animales clínicamente sanos, de 8 a 10 semanas de vida, pueden llegar hasta un 20%. En rastros se han encontrado problemas de otitis media en animales jóvenes y adultos, en un 4% y 32% respectivamente (Cervantes y Aguilar, 2016).

#### 1.4 Pasteurelisis en el conejo

La bacteria *Pasteurella multocida* se considera parte de la microbiota comensal del tracto respiratorio de diferentes especies de animales, puede ser un patógeno primario y secundario en enfermedades respiratorias que afectan a muchas especies domésticas y salvajes, además de a humanos (Wilson y Ho, 2013; Massacci et al., 2018). Tanto en animales como en humanos, las especies de *Pasteurella*, especialmente *P. multocida*, a menudo es asociada con infecciones crónicas y agudas que pueden conducir a una morbilidad significativa (manifestándose como pasteurelisis, neumonía, rinitis atrófica, dermonecrosis, celulitis, abscesos, meningitis y/o septicemia hemorrágica) y mortalidad, particularmente en animales (Wilson y Ho, 2013).

En el caso particular de los conejos, *P. multocida* forma parte del complejo respiratorio, la cual es una de las enfermedades más comunes y severas tanto en conejos de granja como de laboratorio (Selva et al., 2007; Massacci, 2018). La pasteurelisis del conejo se origina por colonización de las vías respiratorias superiores, a partir de esta región, algunas cepas son capaces de invadir otros órganos, desencadenando una gran variedad de signos clínicos. Sin embargo, la patogenia depende de la resistencia del hospedador y la virulencia de la cepa (Selva et al., 2007).

Existen factores predisponentes de la pasteurelisis y que facilitan la colonización bacteriana de las vías respiratorias, se consideran de importancia aquellos factores extrínsecos a *P. multocida*, como los cambios nutricionales, climáticos o de manejo.

(Deeb y Di-Giacomo, 2000), agentes infecciosos como *Bordetella bronchiseptica*, el virus de la mixomatosis o *Mycoplasma sp.* (Rosell, 2000), factores ambientales como la acumulación de amoníaco, la tasa de ventilación, los cambios bruscos de temperatura, el polvo y el tipo de explotación, los cuales facilitan la colonización bacteriana de las vías respiratorias (Selva et al., 2007).

#### 1.4.1 Signos clínicos y lesiones

Las cepas de *P. multocida* a menudo se asocian con infecciones crónicas y agudas, es capaz de migrar a partir de las fosas nasales e invadir otros órganos, lo cual origina una amplia variedad de cuadros clínicos que incluyen: neumonía, rinitis atrófica, dermonecrosis, celulitis, otitis media y tortícolis, conjuntivitis, neumonía y pericarditis, abscesos subcutáneos o en órganos internos, afección del tracto reproductor (metritis y orquitis), septicemia, meningitis y/o septicemia hemorrágica (Selva et al., 2007; Cervantes y Aguilar, 2016; Wilson y Ho, 2013).

Los signos clínicos más representativos son: rinitis (irritación e inflamación de la mucosa nasal) secreción nasal mucopurulenta, ruidos y dificultad respiratoria, es asociada frecuentemente a conjuntivitis (Wilson y Ho, 2013), estos síntomas se engloban en un proceso conocido en terminología inglesa como “snuffles” (coriza) (Fig. 2), esta es la forma más común de pasteurelisis en el conejo (Selva, et al., 2007).



Fig. 2. Coriza en una coneja adulta.  
Obtenida de Selva et al., 2007.

#### 1.4.2 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en el aislamiento e identificación bioquímica del agente bacteriano de *P. multocida*, en agar base sangre al 5%, donde crecen colonias circulares y convexas de color blanquecino, mucosas y no hemolíticas. Por otro lado, en países como España e Italia se implementa la detección serológica de *P. multocida* (Massacci et al., 2018), utilizando el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), el cual se basa en la detección de niveles de IgG séricos, dicha prueba es de utilidad para

diferenciar animales negativos de animales positivos o en proceso de infección inmunorreactiva, incluso brinda la posibilidad de diagnosticar a conejos asintomáticos. Sin embargo, las infecciones agudas pueden no detectarse por serología, así como las infecciones crónicas pueden no llegar a diagnosticarse por técnicas de cultivo microbiológico, por ello se recomienda realizar una combinación de ambas técnicas para disminuir el margen de error (Selva et al., 2007; Wilson y Ho, 2013).

#### 1.4.3 Tratamiento y prevención de la pasteurelosis

*P. multocida* es sensible a antimicrobianos como la penicilina, penicilina-estreptomicina o tetraciclina, sin embargo, estas terapias son relativamente ineficaces debido a la reaparición de los signos clínicos, tras finalizar el tratamiento. La adición de clortetraciclina a la dieta (a dosis de 300-400 gramos/tonelada) ha mostrado ser efectiva en la reducción de la prevalencia de *P. multocida* en el tracto respiratorio superior de conejos adultos aparentemente sanos, aunque no es efectiva en la disminución de prevalencia de pasteurelosis en conejos jóvenes. La mayoría de los aislamientos de *P. multocida* son sensibles a la penicilina, no obstante, el uso de antibióticos no es recomendable debido a la cualidad de los conejos de ser fermentadores cecales, por lo que se reserva sólo para inoculaciones parenterales en hembras y machos de alto valor (Selva et al., 2007).

El control de la pasteurelosis, se basa en las medidas de profilaxis sanitaria, debido a que con ello se disminuye el porcentaje de animales enfermos. Entre las principales medidas con aplicación temporal se encuentran, la eliminación de enfermos crónicos y la desinfección frecuente (entre 5-6 días por semana). Así como la optimización de las condiciones ambientales (regularidad y equilibrio entre la temperatura, humedad y velocidad del aire) (Selva et al., 2007).

#### 1.4.4 *Pasteurella multocida*

*P. multocida* es un bacilo corto, bipolar, capsular, no móvil, Gramnegativo, con 0.3-1.0 µm de ancho y 1.0-2.0 µm de largo, oxidasa y catalasa positivos, no hemolítica. Se divide en 5 serotipos capsulares (A, B, D, E y F), que se clasifican en 16 serovariedades de Heddleston (1-16), basados en antígenos de lipopolisacáridos (LPS) (Townsend et al., 2001; Massacci et al., 2018).

Los distintos tipos de *P. multocida* se asocian con enfermedades específicas en humanos (Caroff et al., 2002) y diferentes especies animales, como es el caso de la

rinitis atrófica de los cerdos, relacionada con los serotipos A y D; la septicemia hemorrágica en bovinos con B:2; B:2,5; E:2 y E:2,5; el cólera aviar con A, F y D, y el complejo respiratorio de los conejos con los serotipos A:3 y A:12 (Cameron et al., 1978; Caroff et al., 2002; Boyce et al., 2004; Massacci et al., 2018). Sin embargo, existen reportes de la presencia de los tipos capsulares A, D y F, a partir de aislamientos en conejos (Jaglic et al., 2004; Cervantes y Aguilar, 2016).

#### 1.4.4.1 Factores de virulencia de *Pasteurella multocida*

Los factores de virulencia (VF, por sus siglas en inglés) más estudiados son el LPS y la cápsula, esta última en el caso del tipo A está compuesta por ácido hialurónico que es un polímero de ácido D-glucurónico y N-acetyl D-glucosamina (Boyce et al., 2004; Harper et al., 2006; Wilson et al., 2013; Massacci et al., 2018), los polisacáridos capsulares son diferentes para cada serovariedad, lo cual permite distinguir los aislamientos en uno de los 5 serogrupos capsulares como los tipos B (arabinosa, manosa y galactosa), D (heparina), E (no caracterizado) o F (condroitina) (Wilson y Ho, 2013).

La cápsula le provee a *P. multocida* resistencia a la desecación, actividad antifagocítica, protección contra la actividad antibacteriana del complemento y actúa como receptor de lectinas, ubicadas sobre las células del hospedero, este mecanismo contribuye a la adhesión previa a la infección por lo anterior, existe la tendencia a considerar a las bacterias capsulares como más virulentas (Boyce et al., 2004; Massacci et al., 2018). Se han descrito diferentes proteínas de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés), actúan también como porinas, es decir, como una barrera selectiva que previene el ingreso de moléculas tóxicas para la bacteria, las cuales son cruciales en su supervivencia en medioambientes adversos, a su vez, contribuyen en la captación de nutrientes, transporte de moléculas dentro y fuera e interacción con los tejidos del hospedero (Balkovetz et al., 2003; Wilson y Ho, 2013) (Fig. 3). Algunos ejemplos de las OMP son el caso de la OMPA la cual funciona como adhesina al unirse a proteínas de la

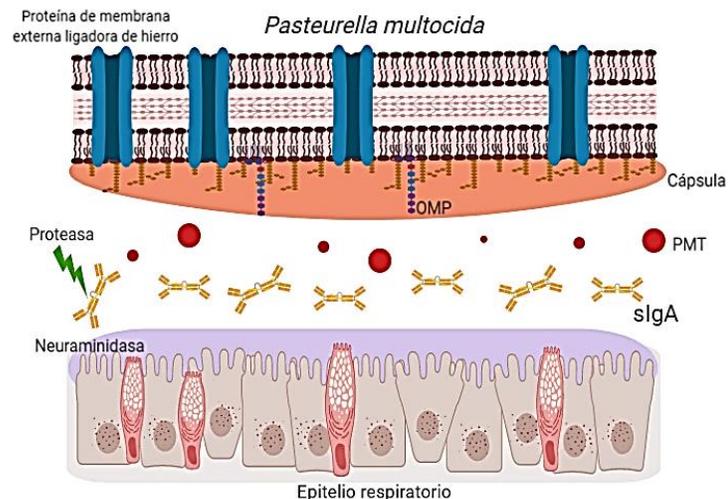


Fig. 3. Factores de virulencia de *P. multocida*. Creado en Biorender 2019.

matriz extracelular del huésped, como la fibronectina y la OMPH, la cual es una porina principal de la membrana externa que forma un canal homotrimérico y ha mostrado cierto potencial como antígeno protector (Wilson y Ho, 2013).

Otras proteínas de importancia son: la proteína de membrana externa ligadora de hierro, proteasas y neuraminidasas, así como el más recientemente sistema propuesto de metilación de la adenina (Boyce et al., 2004).

Se consideran como serotipos toxigénicos a los tipos capsulares D y algunos del tipo A, debido a que liberan la *toxina de Pasteurella multocida* (PMT, por sus siglas en inglés), esta es una proteína AB de 146 kDa que actúa a través de un complejo de vías de señalización intracelular y estimula la formación de rearrreglos del citoesqueleto, actúa como un fuerte mitogéno, protege de la apoptosis, tiene un impacto en la diferenciación y función de las células inmunitarias (Kubatzky et al., 2013). En conejos y cerdos, la toxina PMT es considerada como un agente mitogénico y proliferativo, se ha especulado que la exposición a PMT podría jugar un papel en la predisposición al cáncer como una consecuencia a largo plazo de la infección por *P. multocida* toxinogénica (Wilson y Ho, 2013). En conejos, se ha observado que la PMT purificada tiene la capacidad de iniciar un cuadro neumónico, aunque aún no se conoce su papel específico en la enfermedad natural (Fig. 3) (Boyce et al., 200; Boyce et al., 2004).

Algunos de estos VF se consideran marcadores importantes para definir el potencial patogénico de las cepas de *P. multocida*. Por esta razón, la presencia de genes que codifican la proteína de unión a hemoglobina (*hgbb*, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a transferrina (*tbpa*, por sus siglas en inglés), la hemaglutinina filamentosa (*pfha*, por sus siglas en inglés) y la toxina dermonecrótica (*toxa*, por sus siglas en inglés) se utilizan para caracterizar la virulencia de aislamientos de *P. multocida* (Massacci et al., 2018) (Fig. 3).

En la literatura se informa una correlación entre los VF y los tipos capsulares (Ewers et al., 2006). El gen *pfhA* es usualmente asociado con los serotipos A, B, E y F. Una asociación entre el gen *hgbb*, que codifica la proteína de unión a hemoglobina y el tipo capsular específico D, también se encontró en aislamientos de enfermedades respiratorias en conejos (García-Alvarez et al., 2015).

Se han identificado plásmidos de varios tamaños (generalmente de 1 a 100 kb), la mayoría de estos plásmidos confieren resistencia a varios antibióticos y con frecuencia múltiples, con mayor frecuencia  $\beta$ -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin y sulfonamidas. Además de los genes de resistencia a los antibióticos, también se ha encontrado que algunos de estos plásmidos tienen genes con otras funciones, como los genes de movilización, segregación o

replicación de plásmidos y los genes transportadores de cationes. Muchos de los plásmidos que llevan determinantes de resistencia a los antibióticos son transferibles entre los miembros de *Pasteurellaceae*, así como otras bacterias Gramnegativas (Wilson y Ho, 2013).

#### 1.4.5 Respuesta inmunológica contra bacterias extracelulares

El contacto con una bacteria extracelular no necesariamente implica que se produzca una infección, debido a la presencia de barreras naturales, presentes en los mamíferos, los cuales impiden la adherencia y penetración de tales microorganismos. En esta interacción la integridad de la piel cumple un papel relevante, así como las secreciones que recubren los epitelios mucosos, la saliva, el jugo gástrico, las lágrimas, la orina (por su pH ácido y acción de arrastre), la secreción sebácea y sudorípara, la tos, el vómito y la diarrea. También se destacan la elevación de la temperatura y la alta tensión del oxígeno pulmonar que contribuye a inhibir el desarrollo de gérmenes anaerobios (Bottasso, 2016).

Sin embargo, existen diversos microorganismos que son capaces de evadir estos mecanismos y consiguen infectar al hospedero, provocando la activación de diversas acciones defensivas de la respuesta inmunológica innata. Estos eventos comienzan con la misma infección, con la intención de controlar el proceso infeccioso o de delimitar el mismo hasta que se desarrolle una respuesta inmunológica específica (Bottasso, 2016).

La respuesta inmunológica innata está provista de receptores para reconocer estructuras que comparten numerosos microorganismos, también conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), que desencadenan mecanismos efectores que permiten eliminar agentes patógenos en un corto periodo de tiempo y dirigir el desarrollo de una respuesta inmunológica adaptativa mediada por linfocitos y anticuerpos específicos (Bottasso, 2016).

Actualmente, existen varios estudios sobre la activación del sistema inmunológico por parte de *P. multocida*, por el momento se conoce que genera una inducción de respuestas inflamatorias con destrucción de tejidos, las cuales son activadas por la presencia del LPS y por la exotoxina PMT (presente en los serotipos A y D), la bacteria puede evadir la fagocitosis debido a la presencia de su cápsula y puede reconocer las lectinas, este mecanismo contribuye a su adhesión previa a la infección (Boyce y Alder, 2000).

Además, la presencia de LPS (que es considerado como un antígeno timo independiente) estimula en forma directa a los linfocitos B con producción de IgM, (Bottasso, 2016) antes de ser fagocitada, el LPS, la cápsula y las OMPs de *P. multocida* serán detectados por receptores de PAMPs como los TLRs, una vez fagocitada la bacteria se requerirá del procesamiento y posterior presentación de péptidos en el contexto molecular del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC II, por sus siglas en inglés) por parte las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), generando la activación de linfocitos T helper o cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) que dirigen la expansión y diferenciación de linfocitos B, con la consecuente producción de los diferentes isotipos de anticuerpos. (Bottasso, 2016). Así mismo se sabe que *P. multocida* genera una activación del complemento por la vía de lectinas (inmunidad innata) (Boyce y Alder, 2000), el cual comprende tres fases; 1) Iniciación: reconocimiento de lectinas, estas son azúcares presentes en la superficie de la bacteria; 2) Formación de la convertasa C4b2a con producción de C3b y opsonización de la bacteria; 3) Generación de poros en la membrana del microorganismo por complejo de ataque a la membrana, que median la lisis de éste (Bottasso, 2016).

Por otro lado, *P. multocida* es una bacteria que se adhiere a las células epiteliales, este mecanismo puede ser inhibido por la participación de anticuerpos secretorios del tipo IgA (sIgA, por sus siglas en inglés) (Bottasso, 2016).

#### 1.4.6 Mastocitos

Paul Ehrlich en 1878, describió a los mastocitos por primera vez basado en sus características únicas de tinción y en el contenido de sus gránulos grandes. Por el momento se conoce que los mastocitos juegan un papel fundamental en el mantenimiento fisiológico del organismo, la curación de heridas, la angiogénesis y la defensa contra toda una serie de agentes patógenos, participando tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, contribuyen en el proceso inflamatorio, atrayendo diferentes subpoblaciones de leucocitos al sitio de infección y también tienen un papel fundamental en las enfermedades alérgicas. Los mastocitos pueden encontrarse adyacentes a los vasos sanguíneos y en la lámina propia de la mucosa de la vía aérea. En pacientes asmáticos, pueden migrar a otras estructuras como el epitelio de la vía aérea, las glándulas mucosas y las células del músculo liso. La interacción existente entre mastocitos y las células del músculo liso, induce que estas últimas expresen TGF (Transforming growth factor, del inglés) mediado por la vía de liberación de p-triptasa, resultando en la diferenciación de un fenotipo mucho más contráctil (Pazmiño y Navarrete, 2014).

## 1.5 Inmunización

La inmunización activa, es el proceso de prevención o reducción de las manifestaciones de un agente infeccioso en humanos o animales. Los diseños de los inmunógenos pretenden inducir una respuesta inmune que puede ser mediada por la inmunidad celular y humoral, la cual puede desarrollarse a nivel sistémico y local contra diversos antígenos, dicha inmunidad debe ser de larga duración y altamente específica contra patógenos (Fig. 4) (Gragette et al., 2004; Aguilar y Rodríguez, 2007).

Actualmente el término “vacuna” es referido a la inmunización activa con diferentes tipos de biológicos, a los que también se les refiere de manera general como vacunas. Pero, existen diferentes tipos de biológicos para la inmunización activa de animales y la forma tradicional de dividirlos es la siguiente:

- Vacuna: Son biológicos preparados con virus atenuados, virus muertos o inactivados, bacterias vivas o sus esporas y fases infectantes de parásitos.
- Bacterina: Son biológicos preparados con bacterias muertas.
- Toxoide: Son biológicos preparados con exotoxinas bacterianas inactivadas (Montaraz-Crespo, 2012).

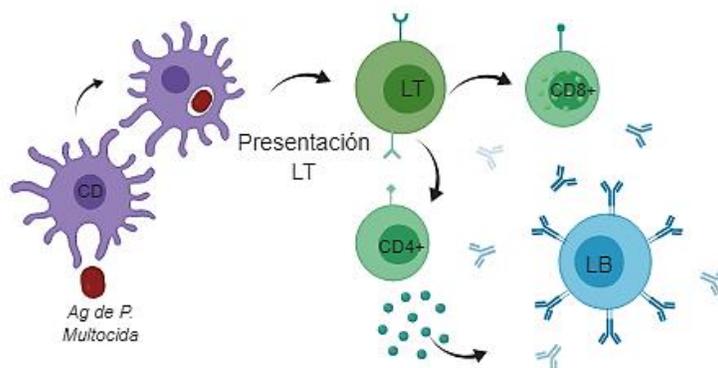


Fig. 4. Modelo simplificado de la activación de respuesta inmune contra un microorganismo. Creado en Biorender 2019.

### 1.5.1 Adyuvante

En la elaboración de los biológicos utilizados para las inmunizaciones se emplean inmunoestimulantes como los adyuvantes (del latín *adiuvans* > ayudar), estos son sustancias antigénicamente inertes que se mezclan con el inmunógeno para aumentar su capacidad inmunogénica (Montaraz-Crespo, 2012). Son utilizados para prolongar la duración de la respuesta inmune además de estimular la inmunidad, se han evaluado varias sustancias con respecto a su capacidad adyuvante, como las sales de aluminio (Fischer et al., 2007). El éxito de muchas

vacunas se basa en su asociación con adyuvantes seleccionados por su capacidad de aumentar su inmunogenicidad y garantizar la protección a largo plazo. En general los adyuvantes disponibles pueden tener efectos adversos debido a su toxicidad (El Ashry y Ahmad, 2012; Kumar et al., 2015).

El adyuvante ideal debería ser económico, biodegradable y capaz de aumentar la respuesta inmune inespecífica y específica (inmunidad celular y humoral), además de tener una larga vida de anaquel. Algunos adyuvantes pueden causar reacciones locales como inflamación, dolor, hinchazón, necrosis celular, úlceras y/o abscesos, así como reacciones sistémicas como náuseas, pirexia, alergia, eosinofilia, anafilaxia, artritis, y enfermedades autoinmunes (Allison y Byars, 1991). En la actualidad existe un mayor control y rigor sobre los adyuvantes aprobados para su uso en humanos en comparación a los utilizados en el sector veterinario, como ejemplo el adyuvante completo e incompleto de Freund y el LPS que no son adyuvantes adecuados para uso humano, debido a las reacciones sistémicas y locales que generan, como es el caso de la formación de granulomas (Marrack et al., 2009; Torres-Ruiz et al., 2016).

### 1.5.2 Estimulación de la respuesta inmune adaptativa por las sales de aluminio

En el año 1926, Alexander T. Glenny propuso la precipitación de un antígeno (Ag) sobre partículas insolubles de aluminio y sulfato de potasio, conocido como "alumbre de potasa", con base en ese compuesto se observó una estimulación de una mejor producción de anticuerpos (Ac) en comparación con la inoculación del Ag sólo, posterior a su descubrimiento se comenzaron a utilizar las sales de aluminio en preparaciones de vacunas con toxoides de tétanos y difteria (*Clostridium tetani* y *Clostridium diphtheriae*, respectivamente). En la actualidad se utilizan, en todo el mundo, sales de aluminio insolubles como principales adyuvantes de vacunas (Marrack et al., 2009).

Además, Glenny (1926) propuso que las sales de aluminio son adyuvantes efectivos porque permiten un almacenamiento de Ag, en el cuerpo, durante mayor tiempo, por lo que se genera una liberación paulatina de Ag en conjunto con las partículas de sal insolubles, resultando en una estimulación efectiva del sistema inmunológico, a este efecto se le conoce en la actualidad como **"Efecto depósito"** (Marrack et al., 2009). En contraste con el efecto depósito, las sales de aluminio insolubles activan las células inmunes innatas generando una respuesta inmunitaria T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 (Figura 6). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la remoción de los nódulos de Ag en conjunto con las sales de aluminio a los 14 días pos-inmunización no genera ningún efecto sobre los niveles de Ac subsecuentes, por lo que deduce que las sales

de aluminio no funcionan simplemente proporcionando un depósito de Ag de larga vida (Marrack et al., 2009).

La estimulación de la inmunidad innata por las sales de aluminio se puede explicar debido a que una vez inoculadas las sales de aluminio inducen una respuesta de citotoxicidad la cual conduce a la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) tales como el ácido úrico, el cual es liberado por la célula necrótica, éste ácido úrico al acumularse en altas concentraciones induce la formación de cristales de urato monosódico (MSU, por sus siglas en inglés), los cuales son fagocitados por las células residentes en conjunto con la fagocitosis directa de las sales de aluminio, lo cual interrumpe la formación de los lisosomas y propicia la liberación de catepsina B (Marrack et al., 2009).

La catepsina B puede inducir directa o indirectamente el eflujo de potasio ( $K^+$ ), esta estimulación activa la familia NLR en el dominio pirina 3 (NLRP3, también conocido como NALP3, por sus siglas en inglés) y el inflamasoma. Posteriormente una señal coestimuladora induce la activación de factores de transcripción que a su vez inducen la producción de pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 y pro-IL-33, que en conjunto con la caspasa 1, que es activada por el inflamasoma de NLRP3, separa las pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 y pro-IL-33, dando como resultado la liberación de las citocinas activas (Marrack et al., 2009) (Fig. 5).

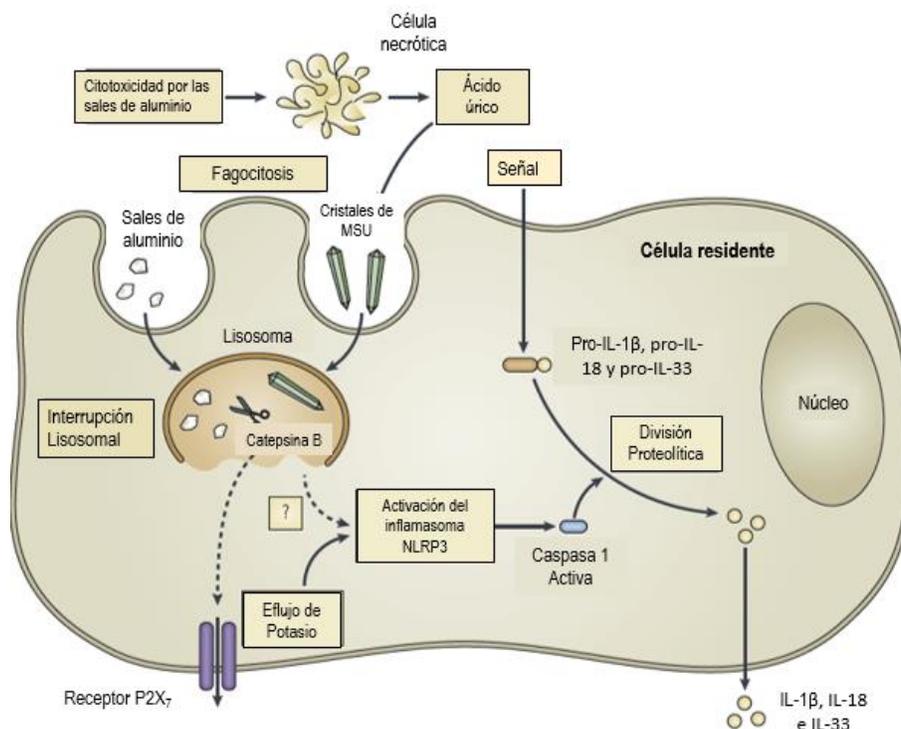


Fig. 5. Activación del inflamasoma NLRP3 por sales de aluminio. Obtenido y modificado de Marrack et al., 2009.

La estimulación de la respuesta inmune innata puede explicarse por los cristales de MSU que son inducidos por sales de aluminio, los cuales activan a los fagocitos en parte a través de la familia NLRP3. De manera hipotética se ha planteado que posiblemente la activación del inflammasoma NLRP3 contribuye a la estimulación de células TH2 que inducen la producción de IL-4 por células TH2 e inmunoglobulina G1 (IgG1, por sus siglas en inglés) y la producción de IgE por las células B, sin embargo, dicho planteamiento hipotético no ha sido comprobado (Marrack et al., 2009).

En contraste las sales de aluminio también inducen la acumulación de monocitos, células GR-1 (marcador de diferenciación celular de monocitos), eosinófilos y neutrófilos en el sitio de inyección. Los monocitos maduran en CD11c y células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), a medida que aumenta el tránsito a los linfonodos se activan las células T CD4+ (Marrack et al., 2009).

Simultáneamente las células GR1 y la secreción de IL-4, suprime la respuesta de las células TH1 y los eosinófilos, mejoran la respuesta temprana de IgM, por las células B. Aunque los neutrófilos se acumulan en el lugar de la inyección, no tienen ningún papel conocido en la inmunidad adaptativa (Marrack et al., 2009) (Fig. 6).

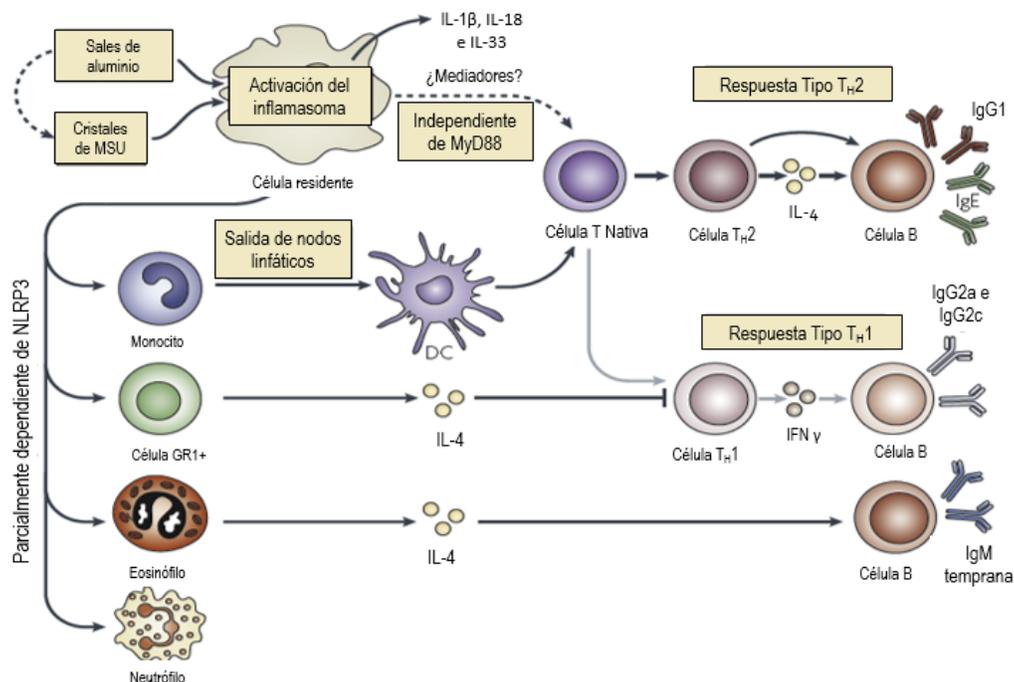


Fig. 6. Estimulación de la respuesta inmune adaptativa por las sales de aluminio. Obtenido y modificado de Marrack et al., 2009

### 1.5.3 Actividad inmunoestimuladora del propóleo

El propóleo se considera **no tóxico** en los rangos de **2 a 7.3 g/kg** en ratones y no muestra alteraciones significativas en la concentración de lípidos, triglicéridos, colesterol y colesterol-HDL (Mani et al., 2006). Diversos estudios, han empleado el uso de propóleo como adyuvante en diversas vacunas virales, demostrando un efecto positivo de las flavonas del propóleo, sobre los niveles de Ac en muestras séricas, así como la subsecuente proliferación periférica de linfocitos en pollos que fueron vacunados contra el virus de Newcastle (Zhang et al., 2006).

En la actualidad, se ha demostrado que el propóleo tiene una intensa actividad sobre el sistema inmunológico, induciendo procesos de fibrosis, cicatrización y aumenta la quimiotaxis de fibroblastos. Dicha acción, se considera como inmunocicatrizal, además incrementa los linfocitos, produce e induce la liberación de citocinas y quimiotaxis de macrófagos, lo que lleva a una elevación de la inmunidad específica celular y humoral de linfocitos (Missima y Sforcin, 2007).

Los ensayos inmunomoduladores han incluido controles positivos tales como LPS, concanavalina A (Con A), acetato de forbol miristato (PMA), citocinas (IFN-gama) u otros para comparar la eficiencia de propóleos (Mani et al., 2006; Sforcin, 2016), en algunos de estos estudios el propóleo ha demostrado poseer un efecto equiparable al efecto inmunomodulador de los controles positivos (como el LPS, Con A, el PMA e INF-gamma) (Sforcin et al., 2005).

Fischer (2006) determinó la asociación de un EEP (extracto etanólico de propóleo) a dosis de 40mg/kg con una vacuna a base de aceite contra el herpes virus bovino tipo 5 (BoHV-5, por sus siglas en inglés), dicha asociación tuvo un resultado significativo ( $p < 0,01$ ) en los niveles altos de anticuerpos neutralizantes, comparado con los bovinos que recibieron la misma vacuna sin propóleo. Estos resultados fueron atribuidos a compuestos fenólicos como la artepilina C (Ácido 3,5. diprenil-4-hidroxinámico) y derivados del ácido cinámico, así como de los compuestos flavonoides que eran abundantes en el extracto de propóleo utilizado, por lo cual propone que los compuestos flavonoides podrían ser las principales sustancias con acción adyuvante.

Sin embargo, Sforcin (2016) utilizando un modelo de inmunosupresión, administró a ratones EAP a dosis de 50 mg/kg, evitó los efectos adversos de la ciclofosfamida y mejoró la tasa de supervivencia de los animales. Por lo tanto, sugiere que el propóleo es capaz de modular la respuesta inmunitaria no específica a través de la activación de macrófagos. No obstante, la administración intraperitoneal de propóleo a dosis de 0.2-1.0 mg/mL estimuló la producción de citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral-alfa), a dosis de 0.150 mg/g también fue capaz

de modular tanto *in vivo* como *in vitro* la producción de C1q por los macrófagos, así como la función del receptor del complemento, a través de citocinas.

### 1.5.3.1 Acción de propóleos sobre los linfocitos y producción de anticuerpos

La acción inmunomoduladora del propóleo se pensaba que era limitada principalmente a los macrófagos y sin influencia sobre la proliferación de los linfocitos. (Sforcin, 2016).

Por otro lado, se ha investigado el efecto del propóleo en humanos con citocinas pro-inflamatorias, después de la administración de cápsulas de propóleo (500 mg/día) durante 2 semanas no se alteraban los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, aunque el propóleo condujo a un aumento de citocinas tanto espontáneas como aquellas inducidas por LPS (Sforcin, 2016).

## 1.6 Antecedentes del uso del propóleo en conejos

Nassar et al. (2012) inmunizó a 56 conejos con una bacterina contra pasteurelisis utilizando al propóleo egipcio como inmunomodulador y adyuvante, por vía subcutánea y vía oral. Posteriormente, los conejos fueron expuestos a una cepa virulenta de *P. multocida*, evidenciando que los animales que fueron tratados con propóleo no presentaron signos clínicos en comparación con los conejos que no fueron tratados con el propóleo, mostrando una presentación aguda de la enfermedad, con signos clínicos como depresión, estornudos y manifestaciones respiratorias que culminaron en signos nerviosos y muerte súbita. Nassar concluye que los resultados obtenidos se debían a los compuestos del propóleo utilizado, como el ácido fenetil éster caféico (CAPE, por sus siglas en inglés), ya que se le atribuye una acción de estimulación del sistema inmunológico, por lo que proponen el uso del propóleo como un posible adyuvante.

Además el propóleo es considerado un bactericida principalmente sobre bacterias Grampositivas sin embargo, se ha observado que tiene un efecto bactericida sobre *P. multocida*, para lo cual existe el antecedente de exponer sensidiscos impregnados con propóleo mexicano a cepas de *P. multocida* tipo A en comparación con antibióticos comerciales, obteniendo como resultado que el propóleo a una concentración de 8 mg/mL producía un halo de inhibición de 0.8 cm, siendo similar al generado por antibióticos como la gentamicina y trimetropin-sulfametazol, pero a diferencia de los antibióticos el propóleo no tiene efecto residual sobre la carne, lo que facilitaría su implementación dentro de un sistema de explotación intensivo (Gutiérrez et al., 2011).

## 2. Justificación

En México se carece de inmunógenos para prevenir la pasteurelisis en conejos, debido a ello se consideró de importancia el elaborar una bacterina contra *Pasteurella multocida* en conejos.

Tomando en consideración las aportaciones en el campo de la apiterapia, se ha demostrado que el propóleo posee diversas propiedades biológicas entre las que resaltan el efecto inmunoestimulador positivo de la respuesta inmune humoral (Fischer et al., 2006; Fischer et al., 2007; Missima y Sforcin, 2007; Sforcin et al., 2007; Sforcin, 2016; Nassar et al., 2012 y Gutiérrez et al., 2015).

Debido a lo anterior se propuso la formulación de una bacterina utilizando al propóleo como un adyuvante, el cual podrá generar una mayor respuesta inmune humoral para prevenir una infección por pasteurelisis en conejos, la cual podrá ser utilizada como base de la posible elaboración de futuros biológicos contra otras enfermedades bacterianas, ya sea en los lepóridos u otras especies.

### 3. Hipótesis

El propóleo al ser utilizado como adyuvante en una bacterina contra *Pasteurella multocida* en conejos producirá una amplificación en la respuesta inmunitaria humoral protectora.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto adyuvante del extracto acuoso de propóleo en una bacterina contra *Pasteurella multocida* en conejos, mediante la cuantificación de los niveles de anticuerpos séricos en una técnica ELISA indirecta y de manera complementaria un análisis macroscópico del daño pulmonar, un análisis histopatológico de muestras de pulmón, corazón, hígado y riñón, así como la cuantificación de mastocitos en muestras histopatológicas de pulmón.

### 4.2 Objetivos específicos

#### Fase 1. Formulación de la bacterina

1. Recolectar propóleo de los apiarios de FESC para la obtención del extracto acuoso de propóleo (EAP) y de EAP del Estado de Morelos, determinando los compuestos fenólicos y flavonoides totales.
2. Preparar bacterinas de *Pasteurella multocida*, usando como adyuvantes el EAP de FESC y el EAP del Estado de Morelos, utilizando otra bacterina con hidróxido de aluminio ( $Al(OH)_3$ ) como referente, para determinar el efecto inmunoestimulante del propóleo.

#### Fase 2. Evaluación del efecto del propóleo

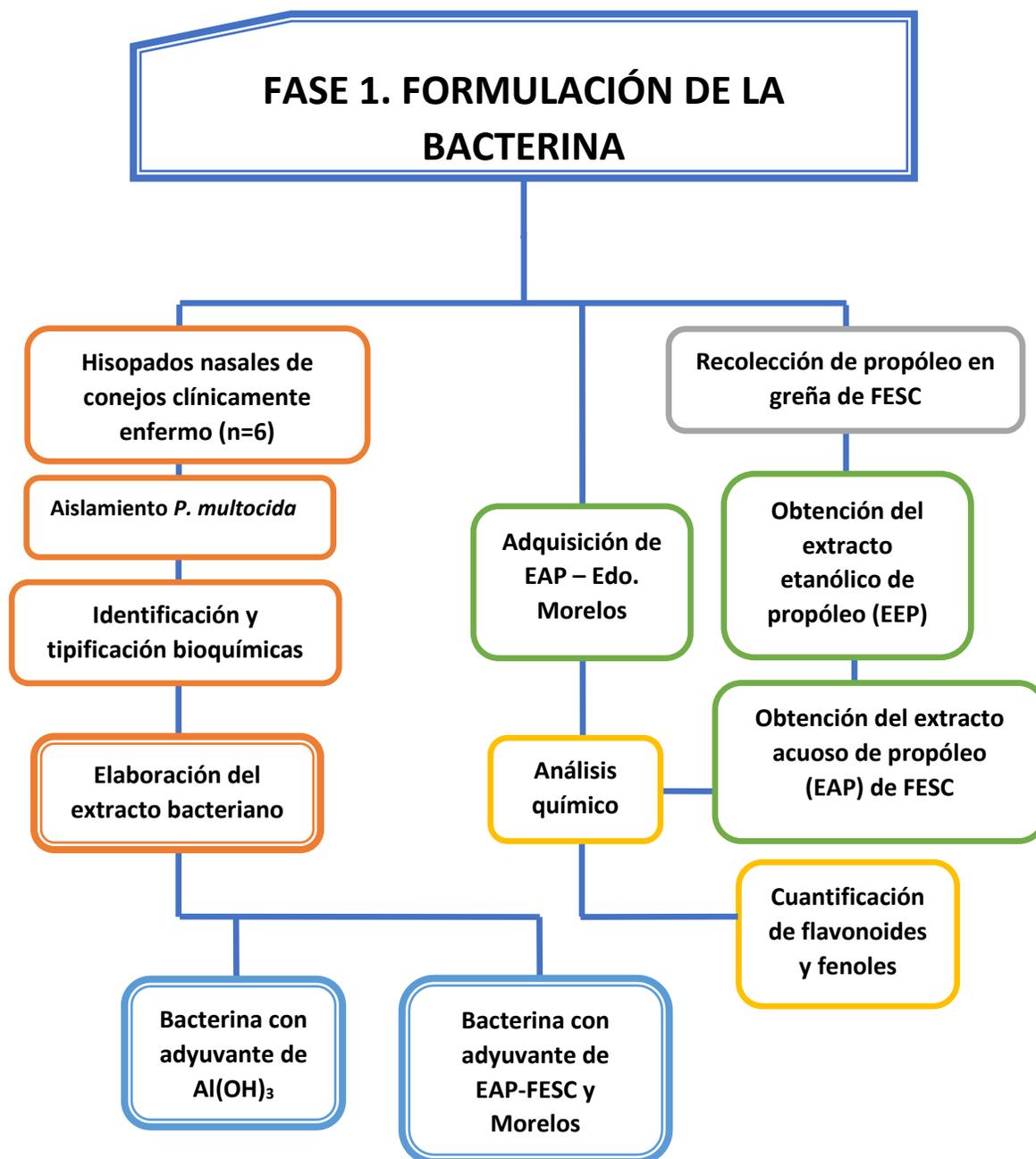
1. Desafiar conejos con *Pasteurella multocida* virulenta, previamente inoculados con una bacterina y diferentes adyuvantes.
2. Evaluar con una ELISA indirecta la producción de anticuerpos séricos y contabilizar los mastocitos de muestras histopatológicas de pulmón.
3. Realizar el análisis macroscópico e histopatológico de los pulmones de conejos inoculados con bacterinas contra *Pasteurella multocida* y con diferentes adyuvantes.

# 5. METODOLOGÍA

---

## 5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

---



## FASE 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROPÓLEO

Modelos biológicos

Toma de muestra de suero basal

Aplicación SC a dosis de 350µg de proteína del extracto bacteriano, en 1mL del adyuvante/conejo, en 3 aplicaciones a intervalos de 15 días

Grupo A: Control con aplicaciones de SSF

Grupo A: Bacterina con adyuvante de Al(OH)<sub>3</sub>

Grupo B: Bacterina con adyuvante de EAP-FESC

Grupo C: Bacterina con adyuvante de EAP-Morelos

Muestras séricas, cada 14 días

Prueba de desafío

Cultivo de *P. multocida* potencializada

Toma Rx al día 0 y 55

Prueba ELISA indirecta

Necropsia

Fotografías de pulmones

Exudados bronquiales

Muestras de tejido

Análisis de imagen (AutoCAD, 2016)

Aislamiento e identificación de *P. multocida*

Histopatología (HE)

Conteo de mastocitos (TA)

ANOVA

Análisis estadístico

Determinar la ganancia de peso

## 5.2 FASE 1. FORMULACIÓN DE LA BACTERINA

---

### 5.2.1 Recolección de propóleo

El propóleo se recolectó en el módulo de apicultura de FESC Campo 4, fue obtenido mediante el empleo de malla y raspado con espátula, en los meses de enero - febrero de 2017. Para protegerlo de los rayos solares se transportó en bolsas oscuras y se resguardó en refrigeración a una temperatura de 1.5-2.5°C, para su posterior proceso (Fig. 7)



Fig. 7. Propóleo en greña, tomada en FESC.

### 5.2.2 Obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP)

El EEP se elaboró a partir del pesaje de 25 mg de propóleo en greña previamente limpiado de las posibles impurezas que pudiera contener por el proceso de extracción, posterior al limpiado del propóleo se preparó etanol al 70%, el cual se adicionó al propóleo en una relación 1:10 para extraer los compuestos bioactivos. La mezcla anterior, se sometió a sonicación en un ultrasonicador (Brason 1800) durante 1 hora, en dos ciclos de 30min, a una temperatura constante de 24°C. La solución se filtró al vacío utilizando un embudo Buchner con un filtro Whatman-número 6, durante 1.5 h.

La extracción del etanol se realizó utilizando un rotovapor (SM-100 PRO) a una temperatura de 70°C y una velocidad de 50 rpm, en 3 ciclos de 30 min, fue de importancia retirar la cera acumulada durante el proceso. Una vez obtenido el EEP se llevó a sequedad en un frasco ámbar, utilizando una bomba al vacío con una campana de vidrio hasta sequedad absoluta. Finalmente, el EEP se almacenó en un envase ámbar y se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 1.5-2.5°C hasta ser utilizado. Lo anterior se efectuó en base a lo estipulado a la NOM-003-SAG/GAN-2017.

### 5.2.3 Obtención del extracto acuoso de propóleo (EAP)

La obtención del EAP se realizó a partir de una dilución de 50 mg/mL de EBP (extracto blando de propóleo) en propilenglicol grado alimenticio. La solución resultante se esterilizó utilizando el método de filtración a través de membrana de 0.2 mm, resguardadas en tubos estériles tipo Falcón y en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

### 5.2.4 Análisis químico del EAP

#### 5.2.4.1 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se efectuó partiendo de 20 mg de EAP, colocados en tubos de vidrio, por triplicado, a cantidades de 250 µL del EAP con 750 µL de agua destilada, obteniendo una concentración final de 0.05 mg/mL del EAP, posteriormente se añadieron 1000 µL de metanol reactivo y 3000 µL de cloruro de Aluminio, al paso de 10 min se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro UV/Vis (Genova MK3), los resultados de absorbancia obtenidos se interpolaron con una curva patrón de calibración (calculada previamente en el laboratorio 6-UIM, FESC), determinando los porcentajes de flavonoides por concentración de la solución estándar de los EAP (Basado en la NOM-003-SAG/GAN-2017).

#### 5.2.4.2 Cuantificación de compuestos fenólicos del EAP por el método de Folin-Ciocalteu

La cuantificación de compuestos fenólicos se determinó a partir de 1 mL de EAP y adicionado con 6 mL de agua destilada en un matraz de aforo de 10 mL. Posteriormente se añadieron 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, con un período de incubación de 5 min. Al finalizar el tiempo de incubación se adicionaron 1.5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de sodio) y se aforaron con agua destilada hasta un volumen de 10 mL. Esta solución se mantuvo en reposo a temperatura ambiente y protegido de la luz solar, permitiendo que se llevara a cabo la reacción durante 2 h. Al término del tiempo establecido se determinó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorbancia UV-VIS, los resultados de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva de calibración, establecida en el laboratorio 6-UIM, FESC-UNAM, dando como resultado los porcentajes de compuestos fenólicos por concentración de la solución estándar del EAP. Lo anterior, se basó en la NOM-003-SAG/GAN-2017).

### 5.2.5 Elaboración del adyuvante a base de EAP

Con la solución del EAP se procedió a realizar diluciones con propilenglicol grado alimenticio determinando una dosis del EAP de 50 mg/kg, la dosis fue determinada de acuerdo a lo reportado por Nassar et al. (2012). Por otro lado, el EAP del estado de Morelos fue adquirido en el centro de distribución Diproansa.

### 5.2.6 Aislamiento de la cepa de *Pasteurella multocida*

#### 5.2.6.1 Identificación bacteriana

El aislamiento de la cepa de *P. multocida* se hizo a partir de 6 hisopados nasales de conejos clínicamente enfermos, dichos conejos fueron muestreados en el módulo de cunicultura de FESC Campo 4, con apoyo de la responsable del módulo la M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández.

La cepa recolectada se aisló en cajas de agar al 5% de sangre bovina, el aislamiento puro se sometió a las pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación bacteriana que posteriormente se compararon con las tablas de identificación bacteriana de Cowan (1975) para lograr la identificación de *P. multocida*, el tipo capsular se determinó por medio de la técnica de descapsulación por hialuronidasa (contenida dentro de los Anexos, Procedimientos, 1).

### 5.2.7 Formulación de la bacterina

#### 5.2.7.1 Extracto bacteriano

El extracto bacteriano partió de una resuspensión de una cepa de *P. multocida* aislada. Dicha cepa fue resuspendida en caldo PPLO enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 0.2%, posteriormente se procedió a la inactivación con formalina acuosa al 10%, se mantuvo en una estufa bacteriológica Brinder para su inactivación durante 24 h (De Navarro et al., 1992 y Massacci et al., 2018, con modificaciones)

Al término de la inactivación el cultivo bacteriano fue centrifugado en 2 ciclos de 15 min cada uno a 3500 rpm, al término se retiró el sobrenadante para una reconstitución con solución salina estéril (SSE). Subsecuentemente se volvió a centrifugar a 4°C/ 3500 rpm/ durante 45 min, el sobrenadante resultante fue reconstituido en una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 4%, posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas de dicho extracto utilizando la técnica de Bradford (1976) descrita en los Anexos, procedimientos, 3. Obteniendo

rendimientos promedios de 3,067.513 µg/µL de proteína totales, por cada 300mL de medio de cultivo.

#### 5.2.7.2 Bacterina con adyuvante a base de hidróxido de aluminio Al(OH)<sub>3</sub>

El protocolo de fabricación de la bacterina se realizó tomando como base lo establecido en las siguientes Normas Oficiales Mexicanas:

- NOM-049-ZOO-1995 “Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelisis neumónica bovina producida por *P. multocida* serotipos A y D”.
- NOM-063-ZOO-1999 “Especificaciones para los biológicos empleados en la prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales”.

Se realizó la resuspensión de la cepa de *P. multocida* en una solución de formol amortiguado al 0.4% y se mantuvo en una estufa bacteriológica Brinder, a temperatura constante de 37°C, para su inactivación durante 24 h. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento utilizado para la elaboración del extracto bacteriano (ver 5.2.7.1., pág. 40) De la solución reconstituida se tomaron 2 mL y se le adicionaron 0.2 mL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 4.66%, una vez suspendido se determinó el pH y se realizó un reajuste del pH, adicionando hidróxido de sodio (NaOH) hasta obtener un pH de 7.0.

#### 5.2.7.2 Bacterina con adyuvante a base de EAP

Se realizó un resuspensión de la cepa de *P. multocida* en una solución de formol al 0.4% y se mantuvo en una estufa bacteriológica Brinder, a temperatura constante de 37°C, para su inactivación durante 24 h. Posteriormente se repitió el mismo procedimiento utilizado para realizar el extracto bacteriano (ver 5.2.7.1., pág. 40). A partir del extracto bacteriano se determinó una dosis de 350 µg/ conejo, la cual fue reconstituida con EAP a dosis de 50 µg/ conejo, previamente filtrado en filtro Micropore de 2 µm, en volumen total de 1 mL por conejo, con un pH de 7.0.

## 5.3 FASE 2. EVALUACIÓN DEL PROPÓLEO

---

### 5.3.1 Modelos biológicos experimentales

Se utilizaron 24 conejos de raza Nueva Zelanda, de 6-8 semanas de edad, todos machos y se establecieron 4 grupos experimentales mediante un diseño al azar, (n=6), los cuales fueron alojados en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM, en las instalaciones de la FESC Campo 4-UNAM, en conejeras individuales de acero inoxidable y fueron alimentados con peletizado comercial (Conejina, Purina®) y agua *ad libitum*.

### 5.3.2 Procedimiento de inoculación

Los conejos de cada uno de los cuatro grupos experimentales se inocularon de la siguiente manera:

- Grupo (A) Control: se les administró subcutáneamente (SC) 1 mL de SSF estéril.
- Grupo (B) Hidróxido de aluminio: fueron inmunizados con una bacterina de *P. multocida* (con volumen total de 1 mL/conejo) con adyuvante de hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) (en una dosis de 50 mg/kg).
- Grupo (C) propóleo FESC: fueron inmunizados con una bacterina de *P. multocida* (con volumen total de 1 mL/conejo) con adyuvante de EAP de FESC (en una dosis de 50 mg/kg).
- Grupo (D) propóleo Morelos: fueron inmunizados con una bacterina de *P. multocida* (con volumen total de 1 mL/conejo) con adyuvante de EAP de Morelos (en una dosis de 50 mg/kg).

Los conejos fueron inoculados en intervalos de 15 días, en un total de tres inmunizaciones para cada grupo experimental. De manera paralela a las inoculaciones, se tomaron muestras séricas una semana antes de la primera inoculación (nivel basal ó día 0), un día antes de cada inoculación (los días 14, 28 y 56), estas muestras séricas se almacenaron en tubos eppendorff estériles, hasta la determinación de los niveles de anticuerpos séricos.

Dentro de los procedimientos de inoculación se usaron 2 conejos como productores de hipersueros, los cuales se tomaron en la prueba de ELISA indirecta como sueros positivos. Estos conejos fueron inoculados con 5 inmunizaciones de una bacterina contra *P. multocida* con adyuvante de hidróxido de aluminio en intervalos de 15 días/entre cada inmunización. Los procedimientos de toma de muestras séricas se hicieron en el día 0 y a intervalos de 14 días posinoculación.

### 5.3.3 Desafío

#### 5.3.3.1 Potencialización de la cepa virulenta de *Pasteurella multocida*

El desafío se realizó utilizando una prueba de “potencia” en base a lo estipulado por la NOM-063-ZOO-1999, dicha norma refiere que para aumentar el efecto patógeno de un microorganismo es necesario realizar 3 pases en ratones de 4 semanas de edad sanos y con un peso de 25-30 g. La prueba de potencia se inició con la activación de la misma cepa de *P. multocida* utilizada en la elaboración de las bacterinas y la prueba de ELISA indirecta, para posteriormente realizar los pases de virulencia.

El proceso de realizar los pases de la cepa virulenta se llevó a cabo mediante inoculaciones intraperitoneales de volúmenes totales de 0.5 mL para cada dilución. Para el caso del primer ratón, el inóculo se elaboró mediante una dilución 1:30 UFC de la cepa de *P. multocida* en SSF; posteriormente se realizó un hisopado bronquial de ambos pulmones del ratón, así como del líquido peritoneal, la muestra fue cultivada en placas de agar base sangre bovina al 5%, se dejaron incubar en una estufa bacteriológica Briday a 37°C durante 24 h.

El primer ratón se sacrificó a las 36 h posinoculación, mediante dislocación cervical, tomando como punto de referencia el “punto de no retorno” establecido por el CICUAE de FESC-C4, UNAM que se encuentra basado en la NOM-033-ZOO-1995, este método fue empleado para todos los ratones empleados durante la potencialización de la cepa.

Las colonias aisladas a partir del primer ratón experimental fueron sometidas a pruebas primarias de identificación, después se realizó una segunda dilución 1:90 UFC utilizando como base dichas colonias aisladas en SSF a un volumen total de 0.5 mL. Esta dilución fue inoculada vía intraperitoneal a un segundo ratón experimental.

El segundo ratón experimental murió a las 13 h posinoculación, realizando la necropsia se hicieron cultivos tanto del líquido peritoneal como de muestras bronquiales, en ambos casos se obtuvo un aislamiento de *P. multocida*. A partir del aislamiento se realizó la identificación de la cepa aislada, para posteriormente elaborar el inóculo a una dilución de 1:250 UFC en un volumen total de 0.5 mL. Esta dilución fue inoculada vía intraperitoneal a un tercer ratón experimental.

El tercer ratón experimental se sacrificó a las 12 h posinoculación, posterior a su muerte se procedió a realizar la necropsia. Finalmente, a partir de las muestras de exudados peritoneales y bronquiales se aisló la cepa de *P. multocida*, considerada finalmente como una cepa altamente virulenta de acuerdo a lo establecido por la

NOM-063-ZOO-1999. Posteriormente cada uno de los cultivos obtenidos a partir de los 3 ratones experimentales se preservaron en congelación a -20°C y -70°C hasta su posterior uso.

#### 5.3.3.2 Elaboración del inóculo de *Pasteurella multocida* virulenta

Al finalizar el proceso de potencialización de la cepa de *P. multocida*, se realizó una resuspensión de la bacteria virulenta en SSF estéril, a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL o el tubo 0.5 de acuerdo al nefelómetro de McFarland. Posteriormente, se inoculó por instilación en la fosa nasal derecha de los conejos experimentales, en volúmenes de 0.5 mL/conejo experimental.

#### 5.3.4 Niveles de anticuerpos

La determinación de los niveles de anticuerpos de los sueros de los conejos experimentales se realizó por medio de la técnica de ELISA indirecta (inmunoensayo indirecto), en base a lo descrito por López et al. (1991), el manual argentino de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina (2009) y Pino et al. (2003).

Los niveles de anticuerpos de los animales control y tratados, se determinaron mediante la técnica de ELISA indirecta, para lo cual se adsorbió un extracto bacteriano de *P. multocida* (utilizada como antígeno) en la placa de ELISA, posteriormente se incubó con los sueros de los animales. La detección de los anticuerpos séricos que se unieron al antígeno se hizo mediante la utilización de un anticuerpo anti-conejo elaborado en cabra y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano). La presencia de los anticuerpos se detectó mediante una reacción colorimétrica utilizando como sustrato peróxido de hidrógeno acoplado a O-fenilendiamina (OPD, por sus siglas en inglés). El análisis de la placa se hizo con un lector de microplacas de ELISA (marca BioRad, modelo 550) a una longitud de onda de 490 nm (contenida dentro de los Anexos, procedimientos 3-4).

##### 5.3.4.1 Extracto bacteriano

El procedimiento de elaboración del extracto bacteriano fue el mismo que el realizado en la elaboración de las bacterinas (ver 5.2.7.1., pág. 40).

#### 5.3.4.2 Rompimiento bacteriano

El proceso de rompimiento bacteriano, utilizado en la elaboración del extracto bacteriano y el reconocimiento de *P. multocida* por parte de las muestras séricas obtenidas a partir de los conejos experimentales, se corroboró por medio de las técnicas de fluorescencia directa e inmunohistoquímica, estas fueron observadas por microscopía óptica en muestras de frotis del extracto bacteriano, así como el marcaje con DAPI observado mediante microscopía de fluorescencia (Ver Anexos, Procedimientos, 2).

#### 5.3.5 Sacrificio y necropsia de los animales experimentales

Los animales experimentales se introdujeron en una cámara de CO<sub>2</sub>, durante 2 min, para insensibilizarlos y después se sacrificaron por dislocación cervical. Se llevó a cabo la necropsia con la obtención de las muestras histopatológicas de diferentes tejidos como fue corazón, hígado, riñones y pulmones, así como tomar las fotografías de los pulmones en vistas dorsal y ventral.

#### 5.3.6 Ganancia de peso

Los animales experimentales fueron pesados al inicio y al final de la prueba experimental, a partir de esos resultados se determinó la ganancia de peso (GP) por animal experimental, utilizando la siguiente fórmula:

$$GP = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{56 \text{ días experimentales}}$$

#### 5.3.7 Lesión pulmonar macroscópica

El porcentaje de lesión pulmonar aproximado fue calculado utilizando el programa Autodesk AutoCAD 2016 y fotografías digitales de los pulmones en vistas dorsal y ventral, en el cual se trazó el perímetro aproximado de cada uno de los pulmones de los animales experimentales, así como de las lesiones pulmonares que fuesen comparables con lesiones neumónicas típicas causadas por *P. multocida* en conejos (Flores y Cruz, 2004).

### 5.3.8 Estudio histopatológico

El proceso de obtención de muestras histopatológicas se realizó mediante la recolección de tejido de 7 mm de espesor, a partir de muestras de corazón en sus cuatro cavidades, muestras de ambos pulmones, de hígado y de ambos riñones. Posterior a la recolección, las muestras fueron fijadas en formalina acuosa amortiguada al 10%. (Ver Anexos, Procedimientos, 5-7).

#### 5.3.8.1 Conteo de mastocitos

El conteo de mastocitos o células cebadas se realizó a partir de cortes histológicos teñidos con TA (Ver Anexo, Procedimientos, 7). El proceso de conteo se realizó en 11 campos al azar no confluyentes, determinando la media del conteo y de los grupos experimentales. Lo anterior fue realizado dentro del laboratorio de histología, Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia, FESC Campo 4, UNAM, bajo la supervisión del Dr. Germán Isauro Garrido Fariña.

### 5.3.9 Tomas radiográficas

La evaluación de las tomas radiográficas se realizó bajo el asesoramiento del Dr. Alejandro Canales (QEPD), partiendo de las radiografías tomadas un día antes de iniciar el experimento y al final del mismo. Para dicha evaluación se realizaron 2 tomas radiográficas por animal experimental, lateral derecha y dorsoventral, las tomas radiográficas se realizaron en el hospital de pequeñas especies, FESC Campo 4, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

### 5.3.10. Análisis estadístico de resultados

Los resultados se compararon mediante una prueba de comparación de medias, mediante una prueba de Buferroni con 95% de intervalos de confianza para comparación de medias y errores estándar, así como un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de doble vía para el análisis de los resultados obtenidos en los niveles de anticuerpos, estos análisis se realizaron en el programa estadístico de R versión 3.4.3 y las figuras fueron realizadas en el programa Graphpad Prism versión 8.0.0.

### 5.3.10.1 Modelo de regresión lineal múltiple

El modelo de regresión lineal múltiple, permite comprender la relación de dos o más variables y relacionar una variable en relación a otras variables, es decir, es cuando dos o más variables independientes influyen sobre una variable dependiente. Además, proporciona el efecto observado dentro de la población o muestra estudiada, mientras que los datos que no tienen el mismo efecto deseado se consideran como datos inexplicables.

El modelo de regresión lineal múltiple se realizó en el programa estadístico de R versión 3.4.3, realizando una correlación entre las variables obtenidas (conteo de mastocitos, daño macroscópico, lesiones histopatológicas y ganancia de peso) en relación con los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, lo anterior fue para todos los grupos inmunizados, con el fin de comprobar la relación existente entre el aumento del nivel de anticuerpos al día 56 con respecto cada una de las variables evaluadas.

## 6. RESULTADOS

---

# 6.1 FASE 1. FORMULACIÓN DE LA BACTERINA

---

### 6.1.1 Recolección del propóleo en greña

### 6.1.2 Análisis químico del propóleo

#### 6.1.2.1 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó de acuerdo a una curva de calibración basada en la NOM003-SAG/GAN-2017. La cuantificación de compuestos flavonoides se realizó en un espectrofotómetro UV/Vis Genova MK3 (Cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Determinación de la absorbancia por dilución de propóleo.</b>				
<b>Muestra de propóleo</b>	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>	<b>Tubo 3</b>	<b>Dilución de propóleo</b>
<b>FESC</b>	0.144 ABS	0.177 ABS	0.163 ABS	1:200
<b>*EAP Morelos</b>	0.443 ABS	0.361 ABS	0.439 ABS	1:300

\*El propóleo del estado de Morelos (Morelos) se manejó una dilución de 0.03 mg/mL.

En base a estos resultados se utilizó la curva patrón establecida para la interpolación de las lecturas de absorbancia de las muestras con la curva de calibración, obteniendo el porcentaje de flavonoides del propóleo (0.05 mg/mL) (Cuadro 2).

<b>Cuadro 2. Porcentaje de flavonoides por concentración de propóleo (0.05 mg/mL).</b>											
<b>Muestra de propóleo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	$\bar{x}$	<b>mg/g EEP</b>	<b>Std. Ded.</b>	<b>%</b>	<b>Dilución</b>
	<b>ABS</b>	<b>ABS</b>	<b>ABS</b>	<b>FLAV</b>	<b>FLAV</b>	<b>FLAV</b>					
<b>FESC</b>	0.15	0.18	0.16	4.69	5.47	5.08	5.08	0.0051	0.390	10.16	1:200
<b>*EAP Morelos</b>	0.44	0.36	0.44	12.88	10.60	12.77	12.08	0.0036	1.288	7.25	1:300

\*El propóleo del estado de Morelos (Morelos) se manejó una dilución de 0.03 mg/mL.

Finalmente se obtuvo el porcentaje de flavonoides por dilución de propóleo (0.05mg/mL) (Cuadro 3).

<b>Cuadro 3. Porcentaje aproximado de compuestos flavonoides totales.</b>		
<b>Muestra de propóleo</b>	<b>Dilución de propóleo</b>	<b>% Flavonoides</b>
<b>FESC</b>	1:200	10.16
<b>*EAP Morelos</b>	1:300	7.25

\*El propóleo del estado de Morelos (Morelos) se manejó una dilución de 0.03 mg/mL.

### 6.1.2.2 Cuantificación de fenoles

La cuantificación de fenoles se realizó de acuerdo una curva de calibración basada en la NOM-003-SAG/GAN-2017 en un espectrofotómetro UV/Vis Genova MK3 (Cuadro 4).

<b>Cuadro 4. Porcentaje de fenoles por concentración de propóleo (0.05 mg/mL).</b>										
<b>Muestra de propóleo</b>	<b>1 ABS</b>	<b>2 ABS</b>	<b>3 ABS</b>	<b>1 Fen</b>	<b>2 Fen</b>	<b>3 Fen</b>	$\bar{x}$	<b>Std. ded.</b>	<b>Equivalentes</b>	<b>%</b>
				mg/g EEP					AG/g EEP	
<b>FESC</b>	0.17	0.17	0.18	0.02	0.02	0.02	0.019	0.0010	381.14	38.11
<b>*EAP Morelos</b>	0.19	0.18	0.19	0.02	0.02	0.02	0.021	0.0008	411.36	41.14

\*El propóleo del estado de Morelos (Morelos) se manejó una dilución de 0.03 mg/mL.

En el cuadro 5 se presenta el porcentaje de compuestos fenólicos obtenido por dilución de propóleo.

<b>Cuadro 5. Porcentaje aproximado de compuestos fenólicos totales.</b>		
<b>Muestra de propóleo</b>	<b>Dilución de propóleo</b>	<b>% fenoles</b>
<b>FESC</b>	1:500	38.11
<b>*EAP Morelos</b>	1:300	41.14

\*El propóleo del estado de Morelos (Morelos) se manejó una dilución de 0.03mg/mL.

### 6.1.3 Cepa de *Pasteurella multocida* tipo A

Los aislamientos de los animales clínicamente enfermos (Fig. 8) se sometieron a pruebas primarias y secundarias, así como la prueba de determinación del tipo capsular se muestran en el cuadro 6. Estos resultados fueron comparados con lo descrito por Cowan (1975), determinando que la bacteria aislada pertenece al género *Pasteurella*, especie *multocida* y tipo capsular A. Estos resultados fueron los mismos durante la identificación bacteriana en el proceso de potencialización de la cepa y en la elaboración de los extractos bacterianos.



Fig. 8. Animal clínicamente enfermo, fotografías tomadas en el módulo de conejos, FESC, UNAM, 2017.

<b>Cuadro 6. Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de la identificación bacteriana.</b>		
<b>Prueba</b>	<b>Tipo de prueba</b>	<b>Resultado</b>
<b>Prueba Primarias</b>	Tinción de Gram	Bacilo corto, Gramnegativo.
	Oxidasa	Positiva
	Catalasa	Positiva
<b>Pruebas Secundarias</b>	Oxido-Fermentativa (OF)	Fermentativa facultativa
	Reducción de nitratos	Positiva
	Reducción de urea	Positiva
	Degradación de sorbitol	Positiva
	Degradación de glucosa	Positiva
<b>Identificación del tipo capsular</b>	Descapsulación con hialuronidasa	Positiva

## 6.2 FASE 2. EVALUACIÓN DEL PROPÓLEO

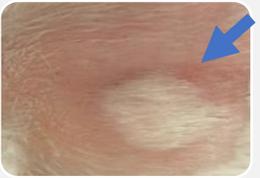
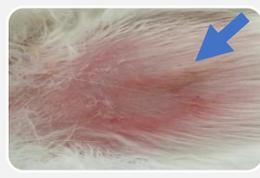
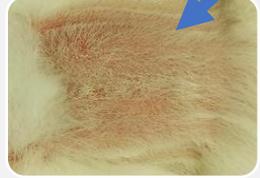
---

### 6.2.1 Modelos biológicos experimentales

### 6.2.2 Procedimiento de inoculación

Los sitios de inoculación de cada conejo fueron evaluados durante los primeros 3 días posteriores a cada inmunización. En el grupo B no se evidenció la presencia de dolor, al momento de la inoculación, escozor ni enrojecimiento. Sin embargo, se observó la formación de granulomas hasta la tercera inmunización, en el 50% de los conejos (Cuadro 7).

En el grupo C se evidenció la presencia de dolor al momento de la segunda inmunización y ligero enrojecimiento en los sitios de inmunización en un 50% de los conejos. En el grupo D se observó una pigmentación amarillenta en la piel y pelo circundante a los sitios de inmunizaciones, desde la segunda inoculación, así como la formación de granulomas en los sitios de inmunización posteriores a la tercera inmunización en menos del 50% de los conejos (Cuadro 7).

<b>Cuadro 7. Fotografías representativas, de las 24 h posteriores, a cada una de las inmunizaciones, de cada grupo experimental.</b>			
<b>Grupo experimental</b>	<b>Primera inmunización (día 0)</b>	<b>Segunda inmunización (día 17)</b>	<b>Tercera inmunización (día 31)</b>
<b>Control (A)</b>			
<b>Hidróxido de aluminio (B)</b>			
<b>Propóleo FESC (C)</b>			
<b>Propóleo Morelos (D)</b>			

Formación de granulomas, evidenciados por la fecha azul.

### 6.2.3 Desafío

Posterior a la instilación de la cepa virulenta en la fosa nasal derecha, los signos clínicos de enfermedad se evidenciaron en un lapso de 48 h. Los principales signos evidenciados fueron la presencia de secreción nasal con o sin estornudos e inapetencia. Se debe enfatizar la presencia de estertores en ambos campos pulmonares del grupo A, así como la presencia de signos clínicos en el 66.67% (4/6). B. 16.67% (1/6). C. 33.33% (2/6). D. 50% (3/6).

#### 6.2.3.1 Potencialización de la cepa virulenta de *Pasteurella multocida*

Los hallazgos a la necropsia del primer ratón fueron la presencia de un absceso de 0.2 mm de diámetro en el lóbulo hepático medio, así como la presencia de consolidación pulmonar en ambos pulmones, este ratón fue sacrificado a las 36 h posinoculación.

El segundo ratón experimental murió a las 13 h posinoculación, como hallazgos a la necropsia se observaron diversas variaciones en las condiciones del líquido peritoneal como fueron: un aumento de volumen del líquido peritoneal, aumento de su viscosidad y coloración amarillenta (Fig. 9), en el resto de los órganos se observaron diversas alteraciones como fueron: el hígado se observó agrandado pero sin irregularidades en su superficie, los pulmones se observaron friables y con presencia de abscesos en la zona apical de ambos pulmones, mientras que en el resto de los órganos no se observaron alteraciones aparentes.



Fig. 9. Lesiones observadas a la necropsia en el segundo ratón para aislar *P. multocida*. Se puede apreciar el aumento de la viscosidad del líquido peritoneal. UIM, FESC-C4, UNAM, 2018.

El tercer ratón experimental se sacrificó a las 12 h posinoculación, posterior a su muerte se prosiguió a la necropsia del ratón experimental, como hallazgos a la

necropsia se encontraron: la presencia de hemorragias en intestinos y en los pulmones se evidenció la formación de focos hemorrágicos, consolidación pulmonar, principalmente en los lóbulos caudales. Además, ambos pulmones se encontraron colapsados y disminuidos de tamaño. Sin embargo, no se observaron abscesos o irregularidades en la superficie de los órganos. En la pared abdominal y torácica se observaron hemorragias, así como un líquido peritoneal grisáceo y un aumento en su viscosidad. Otro hallazgo fue la presencia de conjuntivitis bilateral en menos de 7 h (Fig. 10).

Finalmente, a partir de las muestras de exudados, así como aislamientos directos de pulmones del tercer ratón experimental se aisló una cepa de *P. multocida* que es considerada como una cepa altamente virulenta, de acuerdo a lo estipulado por la NOM-063-ZOO-1999.

### 6.2.5 Niveles de anticuerpos

Las muestras séricas obtenidas de los conejos experimentales a intervalos de 14 días, fueron analizadas utilizando una prueba de ELISA indirecta, las densidades ópticas obtenidas fueron sometidas a una prueba ANOVA de doble vía, obteniendo diferencias significativas, con un intervalo de confianza del 95% (Fig. 11).

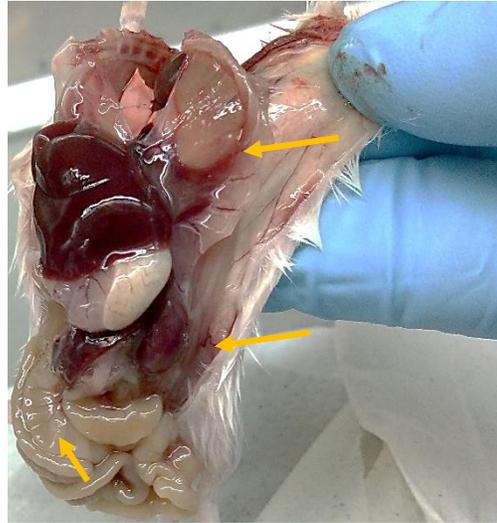


Fig. 10. Lesiones observadas a la necropsia en el tercer ratón inoculado para aislar *P. multocida*. Se observa la presencia de hemorragias en cavidad torácica y focos hemorrágicos en intestinos y pared abdominal. UIM, FESC-C4, UNAM, 2018.

Promedio de la densidad óptica de los niveles de anticuerpos por grupo experimental.

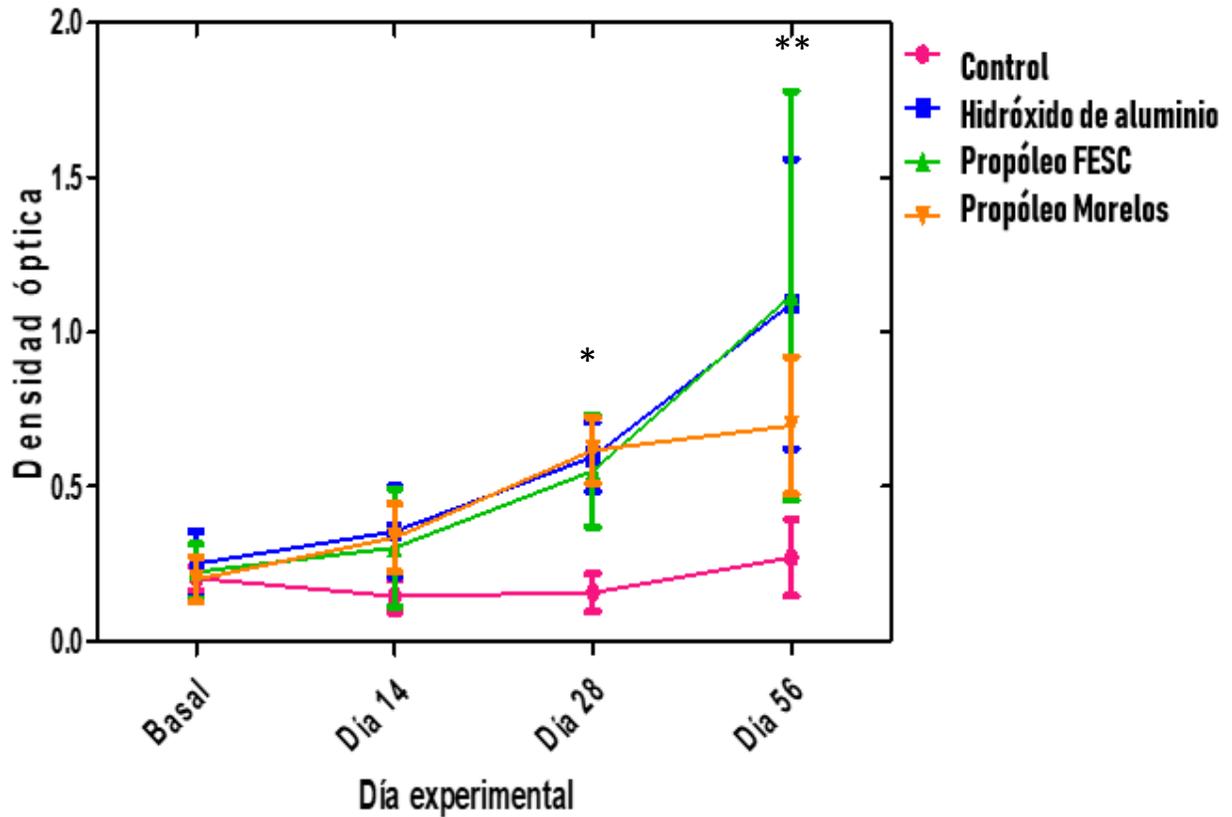


Fig. 11. Determinación de los niveles de anticuerpos en los conejos inoculados con las bacterinas elaboradas con los diferentes adyuvantes. Técnica de ELISA indirecta.

\* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre todos los grupos inmunizados en comparación con el grupo control al día 28

\*\* Diferencia significativa  $P < 0.001$  entre el grupo de hidróxido de aluminio en comparación con el grupo control, al día 56 experimental

### 6.2.5.1 Extracto bacteriano

#### 6.2.5.1.1 Rompimiento bacteriano

Mediante la técnica de inmunohistoquímica se detectó la presencia de más del 80% del rompimiento bacteriano por campo de visión (Fig. 12) y la presencia de material

genético disperso en todos los campos de visión (Fig. 13), lo cual indica el rompimiento de *P. multocida*, utilizada en la elaboración del extracto bacteriano.

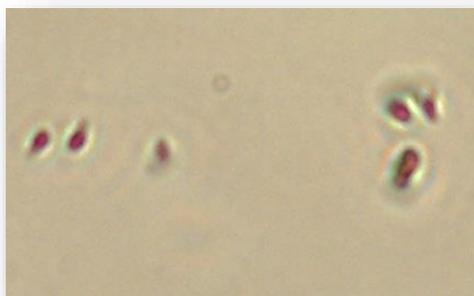


Fig.11. Determinación del rompimiento bacteriano. Técnica inmunohistoquímica indirecta, a 100X. Fotografía tomada en laboratorio. 6, UIM, agosto 2018.

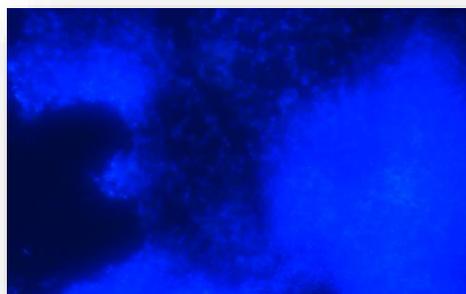


Fig.13. Rompimiento bacteriano de *P. multocida*. Técnica de fluorescencia directa con DAPI para marcar DNA. Observada a 100X. Fotografía tomada en laboratorio. 6, UIM, agosto 2018.

### 6.2.6 Ganancia de peso

La ganancia de peso promedio por grupo experimental se determinó utilizando un análisis de comparación múltiple de Bonferroni, en donde no se obtuvo una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 8) (Fig. 14).

<b>Cuadro 8. Ganancia de peso promedio por grupo experimental.</b>	
<b>Grupo experimental</b>	<b>Promedio GP (kg)</b>
<b>Control</b>	2.8
<b>Hidróxido de aluminio</b>	2.946
<b>Propóleo de FESC</b>	2.992
<b>Propóleo de Morelos</b>	3.03

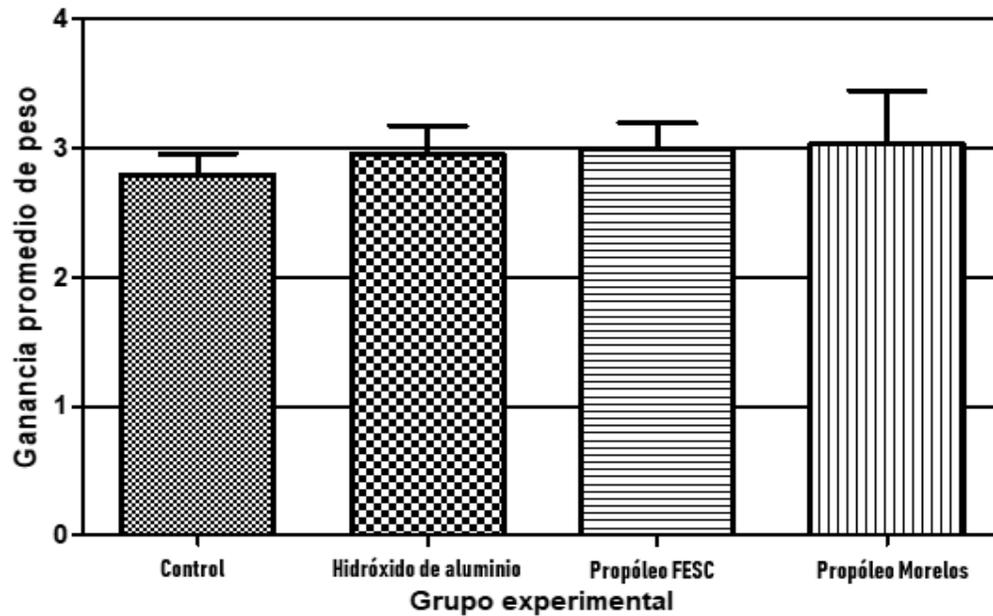


Fig. 14. Ganancia de peso promedio por grupo experimental. Se observa que los tres grupos inmunizados ganaron más peso que el control sin inmunizar, sin embargo, esta diferencia no fue significativa estadísticamente ( $p > 0.05$ ).

### 6.2.7 Sacrificio y necropsia de los animales experimentales

La necropsia de los conejos experimentales evidenció la presencia de pericarditis y glomerulonefritis en 3 conejos del grupo control. Sin embargo, en los conejos de los grupos inmunizados no se evidenció la presencia de anomalías anatomomorfológicas a excepción de lesiones pulmonares (Ver 6.2.8).

### 6.2.8 Porcentaje de lesión pulmonar

Las lesiones pulmonares fueron comparables con lesiones neumónicas típicas causadas por pasteurelisis en conejos, como fue la presencia de bronconeumonía exudativa en casi todos los conejos experimentales, pero con diferente grado de cronicidad (Fig. 15).

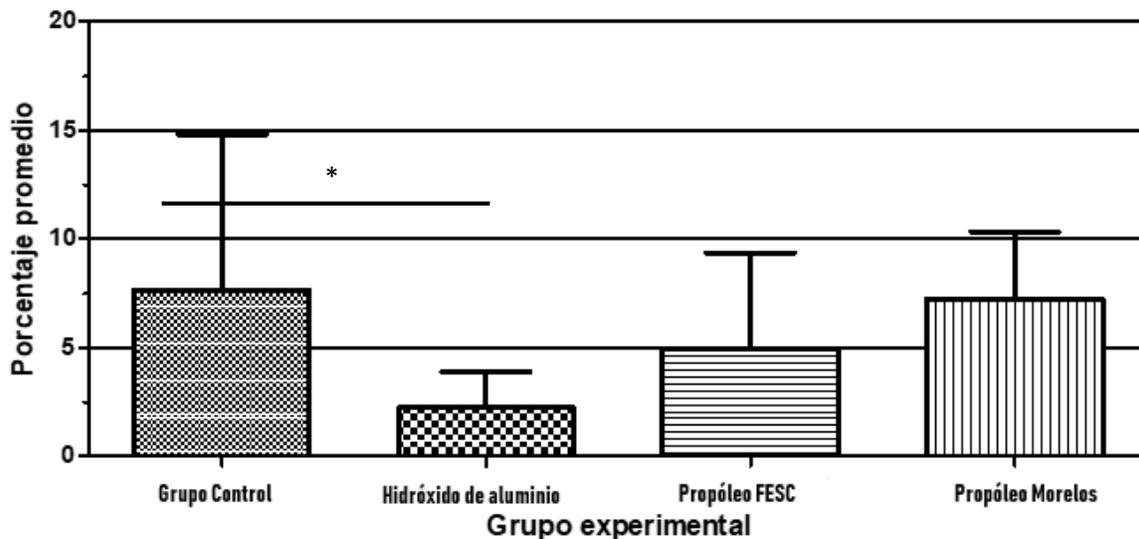


Fig. 15. Porcentaje promedio del daño pulmonar macroscópico. Se realizó una prueba de Bonferroni ( $p < 0.001$ ) para el adyuvante de hidróxido de aluminio en comparación con el grupo control (\*). Se puede observar que no se obtuvo una diferencia significativa debido a la alta variación en los grupos con adyuvante de EAP.

### 6.2.9 Estudio histopatológico

El proceso de análisis de las muestras histopatológicas se realizó en base a una denominación cualitativa determinada por el grado de lesión observado (poco (+), moderado (++) y grave (+++)) de cada uno de los tejidos mencionados (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Representación cualitativa del daño histopatológico observado en muestras de corazón, hígado y riñón por grupo experimental.**

Grupo experimental	Corazón	Hígado	Riñón	Pulmón	Promedio
Control	+++	++	++	+++	+++
Adyuvante de hidróxido de aluminio	-	-	+	-	+
Adyuvante de propóleo FESC	-	+	+	+	+
Adyuvante de propóleo Morelos	+	-	+	++	++

Las lesiones promedio observadas por grupo experimental fueron:

- **Grupo control** (inoculado con solución salina fisiológica): se observó la presencia de glomerulonefritis aguda, pericarditis, inflamación portal mixta con infiltrado de linfocitos, plasmocitos y neutrófilos, este último para el caso del hígado, además de presencia de pleuritis con bronconeumonía exudativa.
- **Grupo con adyuvante de hidróxido de aluminio:** se evidenció la presencia de glomerulonefritis leve, sin embargo, no se observaron cambios anatomopatológicos en corazón o hígado. Además de bronconeumonía exudativa en sólo 1 de 6 conejos.
- **Grupo con adyuvante de EAP FESC:** se observó en el hígado la presencia de inflamación portal mixta con infiltrado de linfocitos y macrófagos espumosos. Así como la presencia de glomerulonefritis leve.
- **Grupo con adyuvante de EAP de Morelos:** se observó la presencia de pericarditis en 3 de 6 conejos experimentales, así como de glomerulonefritis aguda en 2 de 6 conejos.

Las descripciones anteriormente descritas se plantean sólo como hallazgos histopatológicos, sin embargo, se les definió un número en base al resultado promedio dado por cruces para someter los resultados a un modelo de regresión lineal múltiple en conjunto con todas las variables determinadas durante el trabajo experimental (Ver análisis estadístico en este mismo apartado 5.3.10)

#### 6.2.9.1 Conteo de mastocitos

Al término del conteo en 11 campos al azar no confluyentes, se determinó la media del conteo y de los grupos experimentales (Fig. 16). Posteriormente, se realizó una prueba de comparación múltiple de Bonferroni, donde se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control con el grupo de hidróxido de aluminio, con un intervalo de confianza del 95%, sin embargo, para los grupos inmunizados con EAP de propóleo no existió una diferencia estadística debido a la variabilidad de los resultados.

Lo anterior, es indicativo de una disminución del conteo de mastocitos, para los grupos inmunizados.

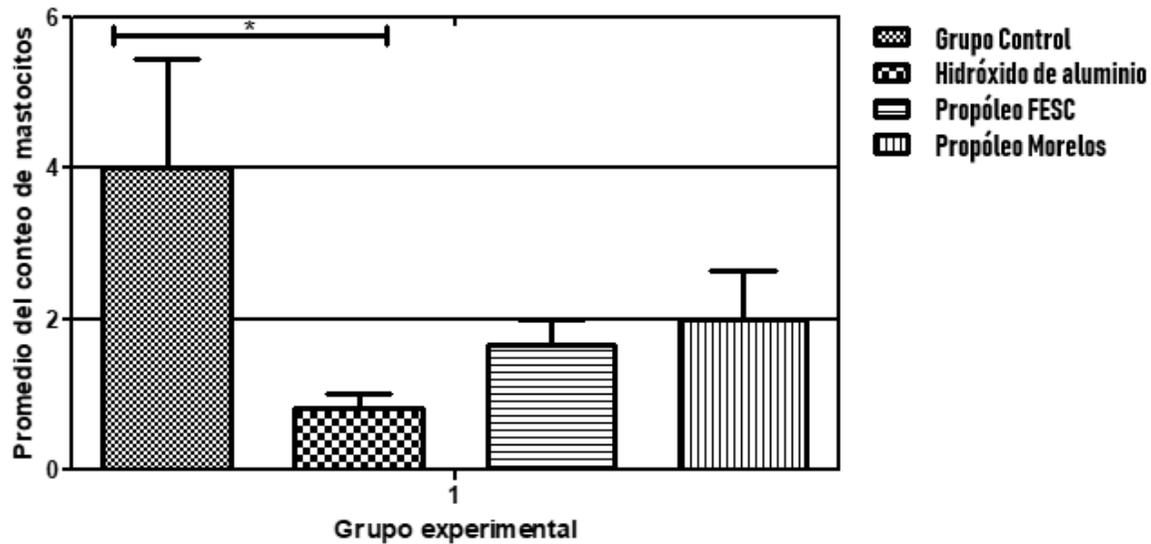


Fig. 16. Conteo promedio de mastocitos por grupo experimental. Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control con el grupo de hidróxido de aluminio (\*). Obsérvese la disminución del conteo de mastocitos para todos los conejos inmunizados.

Mediante la técnica de AT se evidenció la presencia de mastocitos en las zonas periféricas a vasos sanguíneos y alveolos pulmonares, así como de detritus celulares circundantes a los mastocitos (Fig. 17).

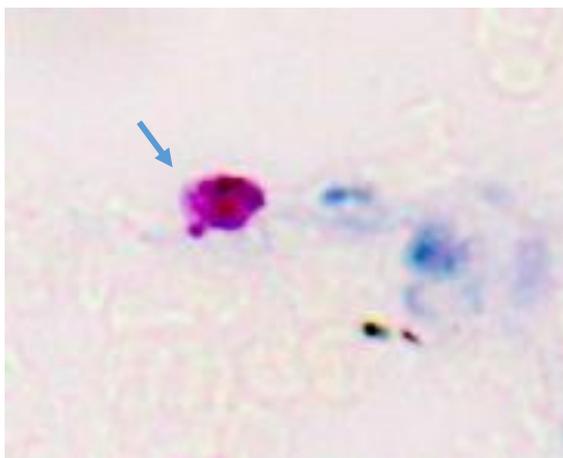
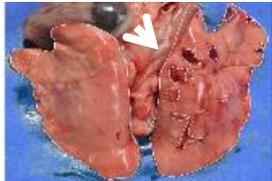
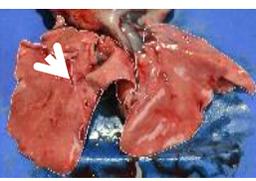
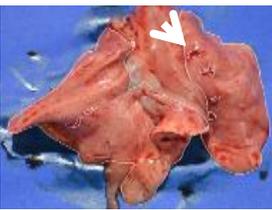
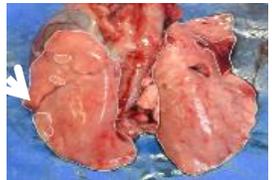


Fig. 17. Presencia de mastocitos en pulmones de conejos, perteneciente al grupo control. Tinción con azul de toluidina. 40X. Fotografía tomada en el Laboratorio de Histología, MVZ, FESC Campo 4, UNAM, septiembre 2018.

### 6.2.10 Evaluación de las radiografías

Las lesiones macroscópicas y las radiografías de tórax se compararon de manera individual por conejo experimental en relación al análisis digital de imagen (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Lesiones macroscópicas representativas por grupo experimental con su respectiva toma radiográfica, correspondiente para cada conejo experimental,**

Grupo experimental	Dorsal	Ventral	Lateral derecha	Dorso-ventral
<b>Control</b>				
<b>Resultados</b>	8.5145% de lesión pulmonar macroscópica		En el área hiliar pulmonar se observa un aumento de densidad radiológica con apariencia de nódulos	Se observó la presencia de algunos nódulos en los campos pulmonares craneal y caudal
<b>Hidróxido de aluminio</b>				
<b>Resultados</b>	3.3075% de lesión pulmonar macroscópica		Se observó un aumento de densidad de los lóbulos craneales a nivel de los broncogramas aéreos.	En las zonas craneales se evidenciaron los bordes pulmonares con presencia de patrón alveolar.
<b>Propóleo FESC</b>				
<b>Resultado</b>	3.0392% de lesión pulmonar macroscópica		Se evidenciaron patrones vasculares y bronquiales en el 60% de los conejos.	
<b>Propóleo Morelos</b>				
<b>Resultados</b>	10.0255% de lesión pulmonar macroscópica		Se evidenciaron patrones vasculares y bronquiales en el 60% de los conejos.	

## 6. 2.11 Análisis estadístico de resultados

### 6.2.12 Modelo de regresión lineal múltiple

Se determinó la correlación entre cada una de las variables (conteo de mastocitos, daño macroscópico, ganancia de peso y lesiones histopatológicas) con respecto a los niveles de anticuerpos obtenidos al día 56 experimental, para los grupos inmunizados. Todos los datos mostrados tuvieron una significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

**a) Daño macroscópico:** se obtuvo una correlación entre la disminución del daño macroscópico en relación al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental, esta disminución fue de 2.0 – 5.3% del daño macroscópico, para el 60% de los conejos inmunizados con EAP (Ver anexo gráfico, Fig. 18.1).

En contraste con la correlación promedio para todos los grupos inmunizados, la cual fue indicativa de una disminución entre 0.17-0.47% del daño macroscópico con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental, para el 40.39% de los conejos (Ver anexo gráfico, Fig. 19.2).

**b) Conteo de mastocitos:** se obtuvo una correlación entre una disminución del conteo de mastocitos en relación al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, esta disminución va de 0.71 – 2.0 del conteo de mastocitos en 11 campos pulmonares no confluyentes, para el 58.3% de los conejos inmunizados con los adyuvantes de propóleo (Ver anexo gráfico, Fig. 18.2).

En contraste con la correlación promedio para todos los grupos inmunizados de una disminución entre 0.01-0.19 del conteo de mastocitos con respecto al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, para el 79.83% de los conejos inmunizados (Ver anexo gráfico, Fig. 19.1).

**c) Ganancia de peso:** se obtuvo una correlación del aumento de la ganancia de peso en relación al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, este aumento fue de 1.79 – 4.06 kg de ganancia de peso promedio, para el 88% de los conejos inmunizados con EAP (Ver anexo gráfico, Fig.18.3).

En contraste con la correlación promedio para todos los grupos inmunizados del aumento promedio entre 0.06 - 0.5 Kg con respecto al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, para el 79.83% de los conejos inmunizados (Ver anexo gráfico, Fig. 19.3).

**d) Lesiones histopatológicas:** se obtuvo una correlación de la disminución del daño celular en relación al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56

experimental, está disminución fue de 0.22 – 1.35% del daño celular en muestras histopatológicas de pulmón, riñón, hígado y corazón, para el 36% de los conejos inmunizados con EAP (Ver anexo gráfico, Fig. 18.4).

En contraste con la correlación promedio para todos los grupos inmunizados de una disminución entre 0.24 – 1.4% del daño celular con respecto al aumento de los niveles de anticuerpos al día 56 experimental, para el 22.14% de los conejos, (Ver anexo gráfico, Fig. 19.4).

### **Correlación entre el daño macroscópico y el conteo de mastocitos**

La correlación entre el daño macroscópico y el conteo de mastocitos, en donde existe un aumento tendiente entre 0.17 – 0.47 % del daño macroscópico con respecto al aumento del conteo de mastocitos, con una significancia estadística de  $p < 0.001$ , para el 40.39% de los conejos experimentales (Fig. 20).

### **Correlación entre la concentración de flavonoides con respecto a los niveles de anticuerpos.**

La correlación es indicativa de un aumento de los niveles de anticuerpos tendiente entre 6.02 – 7.34 con respecto a la concentración de flavonoides totales, para el 89.4% de los conejos, con una significancia estadística  $p < 0.05$  (Fig. 21).

En los anteriores resultados se debe especificar que los porcentajes restantes representan dentro del modelo de regresión a variables inexplicables, dichas variables corresponden a conejos que no tuvieron el resultado esperado con respecto al resto de los conejos de su grupo experimental.

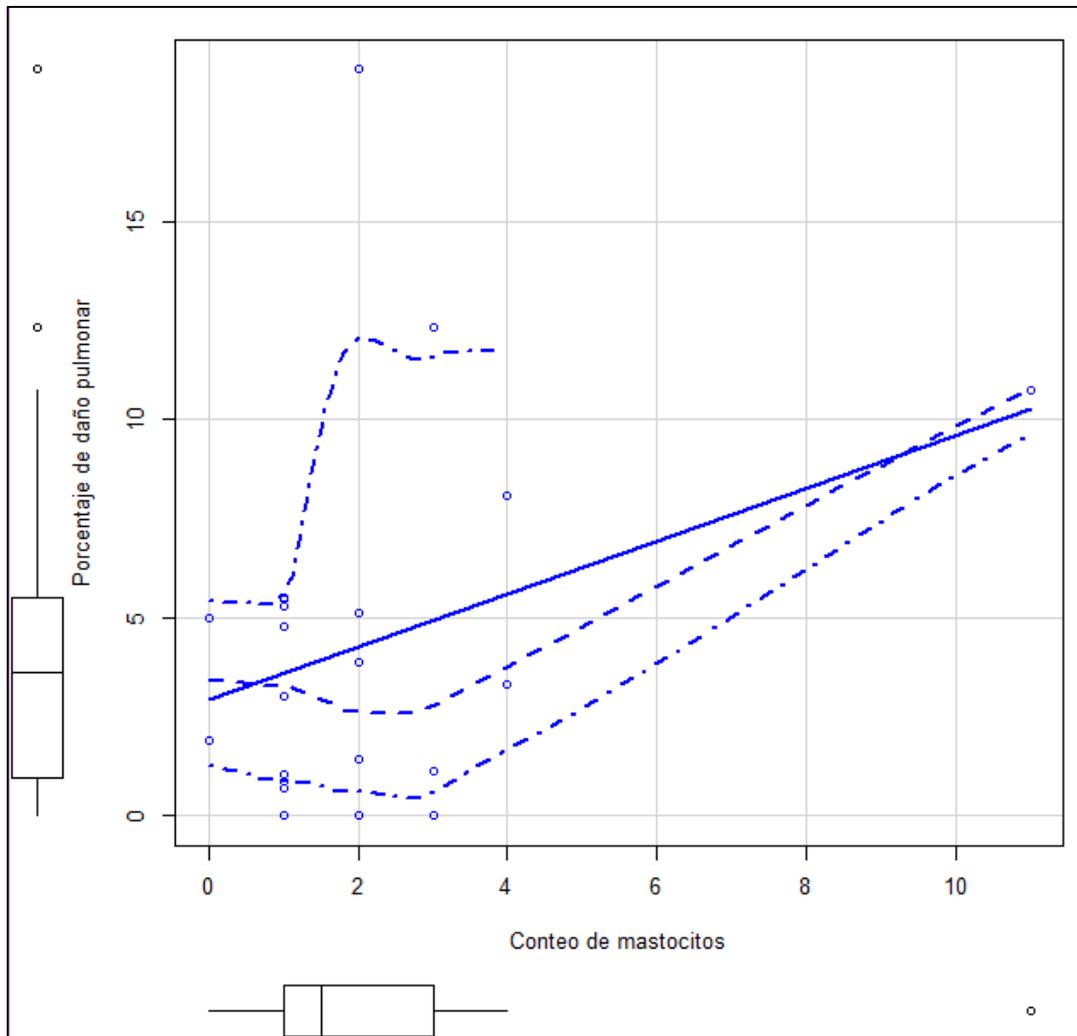


Fig. 20. Correlación entre el conteo de mastocitos y el porcentaje de daño macroscópico pulmonar. Se observa una correlación significativa ( $p < 0.001$ ), con un aumento del daño macroscópico con respecto al aumento del conteo de mastocitos, lo anterior fue representativo sólo para el 50% de los conejos experimentales.

— Línea de mínimos cuadrados (representa la tendencia de la mayoría de los datos, en este caso el 50% de los conejos).

- - - Línea suavizada (representa la variabilidad de los datos).

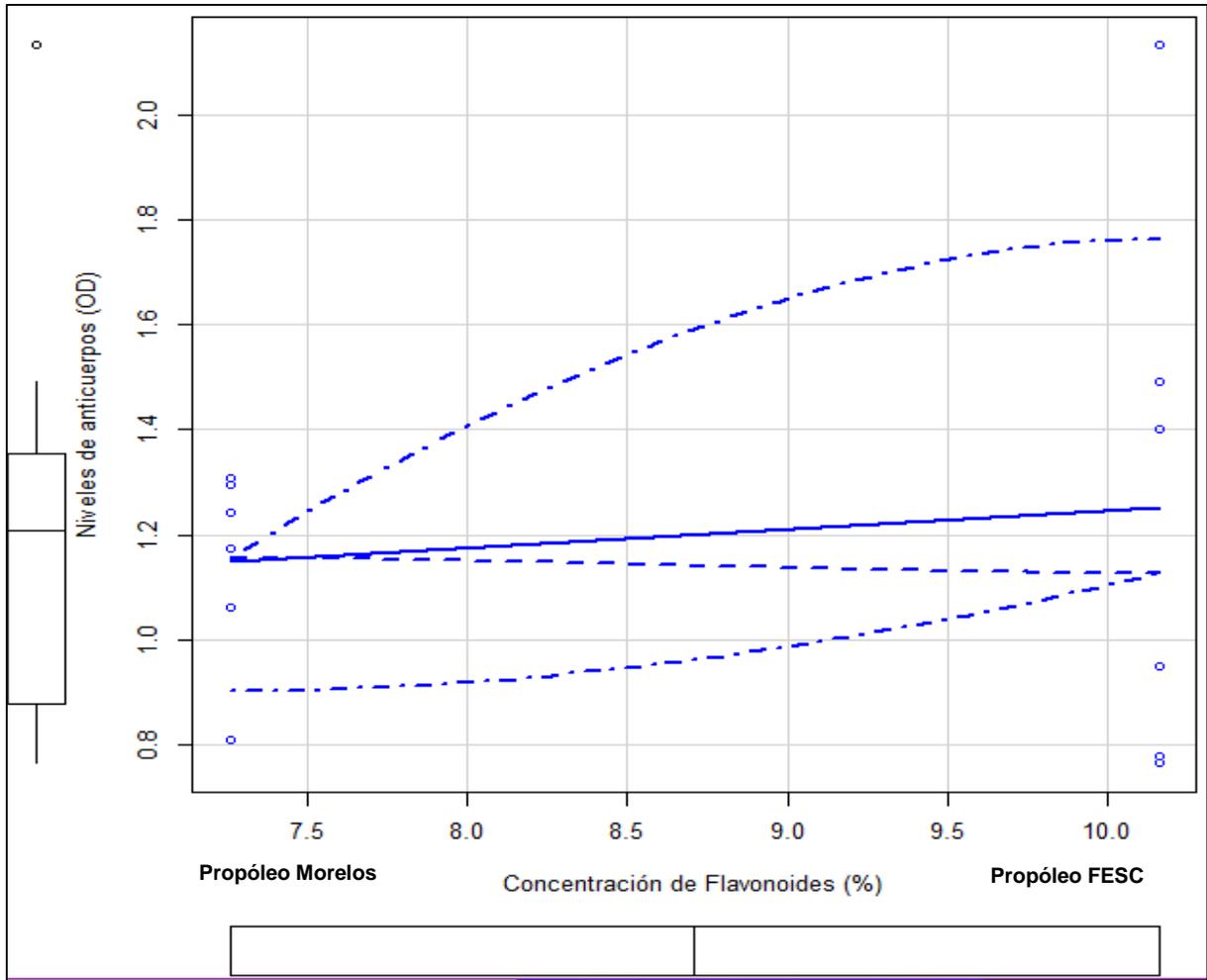


Fig. 21. Correlación entre la concentración de flavonoides y los niveles de anticuerpos al día 56 experimental. Se observa una correlación significativa ( $p < 0.05$ ), del aumento de los niveles de anticuerpos con respecto a la concentración de flavonoides totales, para el 89.4% de los conejos inmunizados con adyuvante de propóleo.

— Línea de mínimos cuadrados (representa la tendencia de la mayoría de los datos, en este caso el 89.4% de los conejos)

- · - Línea suavizada (representa la variabilidad de los datos)

# 7. DISCUSIÓN

---

En México se carece de un inmunógeno para la prevención de la pasteurelisis en el sector cunícola (Cervantes y Aguilar, 2016), por lo que se consideró de importancia el elaborar una bacterina para la prevención de la pasteurelisis en conejos. Asimismo, a nivel internacional surgió un auge del empleo del propóleo como inmunomodulador e inmunoestimulante (Havsteen et al., 2002; Fischer et al., 2006; Fischer et al., 2007; Nassar et al., 2012; Sforcin, 2016;), por lo que se propuso la elaboración de una bacterina utilizando al propóleo en presentación acuosa (EAP) como adyuvante, con el fin de demostrar el efecto inmunoestimulante del propóleo mexicano, así como elaborar una bacterina, la cual se pretende sirva como precedente de futuros biológicos utilizando al propóleo como adyuvante, ya fuese en conejos como en otras especies domésticas y empleando diferentes variedades de patógenos.

La elaboración de los inmunógenos en el presente trabajo se basaron en la NOM – 063 – ZOO – 1999 y NOM - 049 – ZOO - 1995, así mismo, debido a la carencia de una prueba diagnóstica comercial para el diagnóstico serológico de la pasteurelisis en conejos se elaboró una prueba de ELISA indirecta para la detección de los niveles de anticuerpos contra *P. multocida* tipo A en los conejos experimentales, la cual estuvo basada en lo realizado Martínez et al. (2012), el manual de diagnóstico de brucelosis bovina (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Argentina, 2009) y Pino et al. (2003), con diversas modificaciones adecuadas a las posibilidades y recursos con los que se contaba.

La hipótesis y el objetivo del presente trabajo se centraron en demostrar el efecto adyuvante del propóleo en su presentación de EAP, en conjunto con una bacterina contra *P. multocida* en conejos, de acuerdo a los resultados obtenidos se demostró un efecto equiparable al adyuvante de hidróxido de aluminio, lo cual logra evidenciarse al día 28 experimental en donde los niveles de anticuerpos de IgG séricos, para los tres grupos de conejos inmunizados, tuvieron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo control. Sin embargo, al día 56 experimental ya no se presentó una diferencia estadísticamente significativa para el caso del grupo con adyuvante de EAP de Morelos en comparación con el grupo de hidróxido de aluminio. A pesar de ello, se evidenció una tendencia hacia la significancia del grupo de EAP FESC en comparación con el grupo de hidróxido de aluminio.

Lo anterior, es equiparable a lo realizado por Nassar et al. (2012), el cual reporta una mortalidad del 28.57% de conejos inmunizados con una vacuna atenuada de *P. multocida* utilizando al propóleo egipcio como adyuvante, las muertes de sus conejos experimentales se presentaron dentro de las 2 semanas posteriores a la prueba de desafío, además no existieron cambios significativos con demostración

valorable en la ganancia de peso y la disminución del daño pulmonar a la cepa utilizada durante la prueba de desafío. En base a lo anterior, podemos mencionar que en el presente trabajo no se evidenció estadísticamente una diferencia significativa entre las ganancias de peso, lo cual estuvo relacionado con la variabilidad de los resultados en los grupos experimentales, sin embargo, es apreciable una diferencia en el aumento de la ganancia de peso para el grupo con adyuvante de EAP de Morelos, así como un aumento de los niveles de anticuerpos de IgG séricos a partir del día 14 experimental. Además, se evidenció una disminución del daño macro y microscópico pulmonar, así como de una disminución del conteo de mastocitos en muestras histopatológicas de pulmón, conjuntamente con una disminución de lesiones histopatológicas en muestras de corazón, hígado y riñón, lo anterior es comparando a los grupos inmunizados con el grupo control.

Por otro lado, Fischer et al. (2007) demostró la acción del propóleo brasileño como adyuvante auxiliar en combinación con aceite mineral, contra el herpes virus bovino tipo 5 (BoHV-5, por sus siglas en inglés), dicho adyuvante potencializó la respuesta inmune humoral en los bovinos experimentales, reportando la formación de un granuloma, el cual postula fungió como reservorio del antígeno, generando un “efecto depósito”. Sin embargo, también reporta la presencia de abscesos en el sitio de inoculación.

En contraste a lo anterior, en el presente trabajo no se evidenció la presencia de abscesos en los sitios de inoculación durante las primeras dos inmunizaciones, en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, se evidenció la formación de granulomas en menos del 50% de los conejos inmunizados con adyuvante de EAP FESC y de Morelos. Lo anterior, puede estar relacionado con la dosis de propóleo utilizado, así como la presentación de EAP. La dosis utilizada fue de 50 µg de EAP por conejo, mientras que Fischer et al. (2007) utilizó una dosis de 40 mg de EEP en conjunto con aceite mineral por bovino, por lo que se puede suponer que la presentación de EAP es menos irritante para el tejido subcutáneo en comparación con la asociación de EEP con una vacuna a base de aceite mineral.

Equivalentemente a lo descrito por Havsteen et al. (2002), Nassar et al. (2012), Fischer et al. (2006), Fischer et al. (2007), Bankova et al. (2005) y Sforcin (2016), en el presente trabajo también se le atribuye el efecto adyuvante a la presencia y diferente concentración de los compuestos flavonoides. Sin embargo, en comparación a lo realizado por ellos, en este trabajo se utilizaron dos propóleos mexicanos de diferente procedencia, por lo tanto, de dos concentraciones totales de compuestos flavonoides diferentes, siendo para el caso del propóleo de FESC (Cuautilán Izcalli, Edo. México) y el propóleo de Morelos con concentraciones totales de compuestos flavonoides de 10.16% y 7.26% respectivamente. Como ya

se ha reportado en la sección de resultados (Cuadro 3), se realizó un modelo de regresión lineal (ver Resultados 5.2.12), el cual demuestra una diferencia estadística ( $p < 0.001$ ) con un aumento de los niveles de anticuerpos séricos, al día 56 experimental, tendiente entre 6.02-7.34, reportada para el 89.4% de los conejos experimentales con adyuvante de EAP. Se debe señalar, que el porcentaje restante (10.6%) son considerados como eventos inexplicables dentro del comportamiento de los conejos, con respecto al aumento de los niveles de anticuerpos, en ambos grupos experimentales (Fig. 21), dichos eventos inexplicables pudieran ser referidos a factores independientes de cada conejo experimental.

Lo anterior, ha sido reportado en las investigaciones realizadas por Cervantes y Aguilar (2016), Singh et al. (2011), Suckow et al. (1995) y Suckow et al. (2008) quienes reportaron un comportamiento similar al experimentar con vacunas contra *P. multocida* en conejos utilizando adyuvantes como el hidróxido de aluminio y microesferas de alginato así como diferentes vías de inoculación (subcutánea e intranasal), reportaron un aumento de los niveles de anticuerpos séricos de manera irregular para el 80% de los conejos experimentales, sin embargo en el presente trabajo dicho comportamiento tuvo una tendencia a la significancia estadística, reportada para el 89.4% de los conejos.

Conjuntamente con la medición de los niveles de anticuerpos séricos, en el presente trabajo se determinó el porcentaje de daño pulmonar macroscópico aproximado, el conteo de mastocitos en muestras histopatológicas pulmonares, las lesiones histopatológicas representativas para cada grupo experimental y la ganancia de peso. Dichas variables reportadas fueron sometidas a un modelo de regresión lineal múltiple para demostrar estadísticamente la correlación existente entre estas variables y los niveles de anticuerpos séricos al día 56 experimental.

En el modelo de regresión, se reporta una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos con adyuvante de EAP, con una disminución del daño macroscópico, del conteo de mastocitos y lesiones histopatológicas de 59.35%, 58.3% y 35.48% respectivamente, de los conejos. Estos porcentajes reportados son indicativos de una deficiencia en el efecto protector de las bacterinas con adyuvante de propóleo, lo cual podría relacionarse con una deficiente estimulación de inmunoglobulina A secretora (sIgA, por sus siglas del inglés), la cual se conoce como la responsable de la protección en las mucosas, como podría ser el caso de la mucosa respiratoria. Lo anterior está relacionado a lo descrito por Suckow et al. (1995) y Suckow et al. (2008), quien reportó un aumento de IgA al administrar por vía subcutánea e intranasal vacunas contra *P. multocida* (para los tipos A y D) y la toxina de *P. multocida* (PMT) respectivamente, utilizando como adyuvante microesferas de alginato. Sin embargo, a pesar de demostrar un aumento de los niveles de IgA en

secreciones mucosas del aparato respiratorio, estos niveles no fueron suficientes para conferir una protección total del aparato respiratorio, confiriendo una protección parcial contra el desarrollo de neumonía, pleuritis y necrosis hepática, siendo indicativo de la supervivencia de los conejos a una infección de pasteurelisis.

Por otro lado, los modelos de regresión lineal corroboran una correlación existente entre las variables explicativas con respecto a los niveles de anticuerpos resultantes al día 56 experimental para todos los grupos inmunizados. Dentro de las variables explicativas se encuentran el conteo de mastocitos en muestras histopatológicas de pulmón, el porcentaje de daño macroscópico, la ganancia de peso y las lesiones histopatológicas (a partir de muestras de corazón, hígado, riñón y pulmón), para dichas variables se demostró una correlación para el 79.83%, 40.39%, 79.83% y el 22.14% respectivamente, de los conejos inmunizados. En base lo anterior se encontró una relación a lo descrito por Cervantes y Aguilar (2016), Nassar et al. (2012), Suckow et al. (1995) y Suckow et al. (2008) quienes reportaron una protección parcial contra el desarrollo de pasteurelisis en conejos.

A pesar de reportar unos porcentajes tan bajos dentro del modelo de regresión, se puede sugerir que el efecto protector parcial fue suficiente para generar una disminución del conteo de mastocitos en muestras histopatológicas de pulmón, este conteo es indicativo de un posible control dentro de la reducción del proceso inflamatorio en el tejido pulmonar. Además, se demostró una disminución del desarrollo de pericarditis en muestras de tejido cardiaco, así como de lesiones hepáticas. Sin embargo, no existió una disminución de lesiones en muestras histopatológicas de riñón, debido a que existió una prevalencia del 58.3% de glomerulonefritis membranoproliferativa en los grupos inmunizados con adyuvantes de EAP. Una posible respuesta de lo anterior, podría ser el hecho de que las bacterinas simulan una infección natural con el objeto de producir inmunidad protectora, implicando la activación del sistema inmune innato. En conjunto con el efecto producido por algunos adyuvantes como el hidróxido de aluminio, el cual desencadena en el tejido inoculado daños celulares que pueden fungir como DAMPs, con la consecuente activación de receptores de reconocimiento de patrón y liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , ésta última induce la maduración de monocitos en células dendríticas, aumenta las moléculas coestimuladoras y la expresión del complejo principal de histocompatibilidad y junto con IL-6, favorece la secreción de anticuerpos (Torres-Ruiz, 2016). En este ambiente proinflamatorio, el daño tisular local promueve modificaciones en la estructura terciaria de las proteínas, lo que puede provocar que sean reconocidas como antígenos y promover una respuesta autoinmune patogénica. Dicha respuesta puede también ser mediada por linfocitos B y T auto-reactivos espectadores. Lo anterior, Shoenfeld y Agmon-Lein (2001) lo definieron

como síndrome autoinmune/autoinflamatorio inducido por adyuvantes (abreviado como ASIA, por sus siglas en inglés), el cual describe un conjunto de condiciones que son el resultado de una respuesta inmune a los adyuvantes (Torres-Ruiz, 2016).

El adyuvante por sí mismo (por ejemplo,  $Al(OH)_3$ ) puede ser fagocitado por macrófagos y acumularse en el citoplasma en forma de nanocristales de MSU, favoreciendo la activación de linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas e inclusive la formación de folículos linfoides, dando origen a miofascitis macrofágica. Dichas células pueden alcanzar la circulación sistémica mediante su migración a órganos linfoides secundarios, lo que puede originar manifestaciones generalizadas de la enfermedad en un sujeto genéticamente predispuesto (Torres-Ruiz, 2016). En este estudio, se puede presuponer que el EAP de Morelos tuvo un efecto similar al proceso inflamatorio ocurrido durante el ASIA, lo cual resultó en el desarrollo de glomerulonefritis membranoproliferativa ocasionada por la formación de complejos inmunes.

En otro estudio, se evidenció que la administración por vía subcutánea de neovestitol, un isoflavonoide aislado de propóleo rojo brasileño, redujo la migración de neutrófilos inducida por LPS, la cual se encuentra relacionada con una expresión reducida de ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular tipo 1) en la microcirculación mesentérica de ratones, así como un aumento de los niveles de óxido nítrico en la cavidad peritoneal de ratones en un lapso de 4 h (Franchin y Colón, 2016). Lo anterior, podría ser similar al efecto observado con el EAP de FESC al ser inoculado por vía subcutánea. En relación, en el presente trabajo no se realizó la determinación de los compuestos flavonoides, sin embargo, Betancourt y Cruz (2016) en un análisis de cromatografía de gases acoplado a masas, determinaron los compuestos presentes en el propóleo de FESC, dicho propóleo se obtuvo en una recolecta invernal (2014), determinando la presencia de pinocembrina, el cual es una flavona. Lo anterior, se tomó como base debido a la similitud en época y zona de recolecta (FESC, Cuautitlán Izcalli, estado de México).

Asimismo, de acuerdo a lo descrito por Franchin y Colón (2016) la reducción de la migración de neutrófilos inducida por el LPS ayudaría a evitar el desarrollo de ASIA en los ratones inmunizados con el adyuvante de EAP de FESC, lo cual fue evidenciado en la disminución de la presencia de glomerulonefritis membranoproliferativa en los conejos inmunizados con adyuvante de EAP de FESC, a diferencia del adyuvante de EAP de Morelos, donde se observó glomerulonefritis membranoproliferativa.

En el presente trabajo, otra de las variables analizadas fue el conteo de mastocitos en muestras histopatológicas de pulmón, que demuestra una disminución entre 1.26-4.98 del conteo de mastocitos, en relación al aumento del nivel de anticuerpos

al día 56 experimental, para el 49.46% de los conejos experimentales, con una significancia estadística de  $p < 0.001$  (Fig. 19).

En un estudio sobre cinética de la respuesta celular durante una infección pulmonar, se realizó midiendo niveles de CD4+, CD8+ y mastocitos en pulmones de cerdos *in situ* evaluando una infección experimental de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Al día 8, el aumento de mastocitos se produjo principalmente en los bronquiolos de diámetro pequeño ( $< 80 \mu\text{m}$ ). Asimismo, en el límite entre el tejido conectivo externo y la capa muscular, se observaron mastocitos en la mucosa bronquiolar, la pleura y los tabiques interlobulillares, con una asociación aparente a los vasos linfáticos y al aumento de niveles de CD8+. Demostrando que los mastocitos estaban asociados a BALT (Broncus Associated Lymphoid Tissues, del inglés), pero no dentro del BALT ni en vasos sanguíneos, pero si eran evidentes en las vénulas y en septos infectados (Cruz et al., 2008).

Por el momento se carece de estudios sobre la participación de los mastocitos durante la infección de pasteurelosis en conejos, sin embargo Bernd & Müller (1995) estudiaron la distribución de células CD4+ y CD8+ en una infección intratraqueal con *P. multocida* en pulmones de cerdos libres de patógenos, demostrando una acumulación temprana en el parénquima pulmonar y zonas perivasculares y peribronquiales después de 8 h. Lo anterior, en conjunto con lo descrito por Cruz (2008) brindan un indicativo de la relación existente entre el daño pulmonar ocasionado por una infección bacteriana y el subsecuente incremento del daño pulmonar inducido por un aumento desproporcionado de mastocitos.

Consecuentemente, se han demostrado las implicaciones de los mastocitos durante procesos asmáticos, en donde se ha demostrado que pueden llegar a detectarse aumentados en el BAL de estos pacientes, los cuales son retados con alérgenos que inducen vasodilatación, contracción del músculo liso y secreción de moco (Pazmiño et al., 2014). Lo anterior, sería explicativo del desarrollo de una bronquitis exudativa en una infección por pasteurelosis en conejos, desencadenando como resultado dificultad respiratoria con la consecuente muerte de los conejos.

Finalmente, en este trabajo se evidenció el efecto inmunoestimulante de dos propóleos mexicanos en una bacterina contra *P. multocida* tipo A en conejos, el cual tuvo una tendencia a la significancia al día 56 experimental, respecto al aumento de los niveles de anticuerpos IgG séricos. Sin embargo, a pesar de no obtener el efecto protector deseado, este es equiparable al efecto protector demostrado en otros estudios de inmunógenos contra *P. multocida* en conejos, los cuales utilizaron otros tipos de antígenos y adyuvantes (Cervantes y Aguilar (2016), Nassar et al. (2012), Suckow et al. (1995) y Suckow et al. (2008)). Así mismo, se demostró la correlación entre el porcentaje total de compuestos flavonoides en comparación con los niveles de anticuerpos de IgG séricos, que es equiparable a lo demostrado por Havsteen et

al. (2002), Nassar et al. (2012), Fischer et al. (2006), Fischer et al. (2007), Sforcin et al. (2005) y Sforcin (2016).

Adicionalmente, se hizo evidente una correlación existente entre los niveles de anticuerpos de IgG séricos y la disminución del conteo de mastocitos en muestras histopatológicas pulmonares, así como el porcentaje de daño pulmonar macroscópico aproximado.

Por otra parte, este trabajo demostró la correlación existente entre el conteo de mastocitos con respecto al daño macroscópico pulmonar, el cual es un resultado que no ha sido reportado por otros autores, para el caso de la pasteurelisis en conejos.

# 8. CONCLUSIONES

---

Los propóleos mexicanos procedentes de FESC (Cuautitlán Izcalli, edo. México) y Morelos (edo. de Morelos, México) mostraron tener un efecto inmunoestimulante equiparable con el adyuvante de hidróxido de aluminio. Dicho efecto inmunoestimulante se hizo evidente por el aumento de niveles de IgG séricos en conejos al día 56 experimental, en tres inmunizaciones. Además, mostraron un efecto protector en el tejido pulmonar comparable con otras investigaciones.

Los resultados obtenidos a pesar de no ser estadísticamente representativos, representan un efecto equiparable al adyuvante de hidróxido de aluminio, en donde la ganancia de peso fue mayor para el adyuvante de EAP de Morelos (3.03 kg) con respecto al adyuvante de hidróxido de aluminio (2.95 kg), el conteo de mastocitos para el adyuvante de EAP de FESC se redujo a la mitad (conteo de 2) en comparación al grupo control (conteo de 4), así como en las tomas radiográficas se observaron los patrones vasculares y bronquiales normales para el 60% de los conejos inmunizados con adyuvante de ambos EAP.

Además, se demostró una correlación existente entre la concentración de compuestos flavonoides y el aumento de los niveles de anticuerpos, obteniendo mayores niveles de anticuerpos (entre 6.02 – 7.34) con respecto a una mayor concentración total de compuestos flavonoides, en el 89.4% de los conejos. Sin embargo, lo anterior no se encuentra correlacionado con respecto a un mejor efecto protector en el tejido pulmonar.

El conteo de mastocitos en muestras histopatológicas mostró una correlación con el daño pulmonar, siendo un indicativo de su relación con la respuesta inmunitaria durante una infección de pasteurelosis en conejos, generando un aumento del daño macroscópico de 1.3 – 5.0% con respecto al aumento del conteo de mastocitos.

Conjuntamente, se espera que la técnica ELISA indirecta sirva como precedente del desarrollo de un método serológico de diagnóstico para la pasteurelosis en conejo, así como las bacterinas contra *P. multocida* tipo A con adyuvante de EAP sean el antecedente de nuevos usos de la inmunoestimulación del propóleo mexicano.

## 9. PROSPECTIVAS

Finalmente, dentro de las perspectivas del presente trabajo se encuentran:

1. Determinar por medio de un análisis de cromatografía de gases masa la composición de los compuestos flavonoides contenidos dentro de los propóleos utilizados, para determinar el compuesto responsable del efecto inmunomodulador, descrito dentro del presente trabajo.
2. Realizar la purificación del antígeno utilizado para la prueba de ELISA indirecta.

# 10. ANEXOS

---

## Protocolos

### 1. Prueba de descapsulación por hialuronidasa

1. Siembra de la cepa utilizada en agar base sangre bovina al 5%, por estría continúa.
2. Al centro de la caja sembrada se sembró una muestra de *S. aureus* productora de hialuronidasa.
3. Incubación por a 37°C durante 24, en una estufa bacteriológica Brider.
4. Se reportó como positiva al tipo capsular A, al existir una disminución del tamaño de la cápsula de *P. multocida* alrededor de la cepa sembrada de *S. aureus*.

### 2. Técnica de inmunohistoquímica y fluorescencia directa

1. La técnica se realizó en un frotis del extracto bacteriano directo, la cual fue fijada por medio de calor directo.
2. Se permeabilizó durante 5 min con Tritón al 0.5% en PBS-1x.
3. Se realizaron tres lavados por inmersión en una solución de PBS-1X.
4. El bloqueo se realizó en la superficie de la laminilla con leche descremada al 5% durante 20 min.
5. Se colocaron 100 µL de una muestra sérica de conejo positiva a *P. multocida*, obtenida a partir de un conejo hiperinmune, así como 100 µL de una muestra sérica de conejo negativo a *P. multocida*, obtenida a partir de un conejo clínicamente sano y negativo al aislamiento bacteriano.
6. Las laminillas con los sueros positivos y negativos se mantuvieron en refrigeración durante una noche.
7. Posteriormente se realizaron nuevamente tres lavados por inmersión en PBS-1x.
8. Se adicionaron 100 µL por frotis del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP a una dilución de 1:2 000 durante 1 h.
9. Se repitieron tres lavados por inmersión en PBS-1x.
10. Paulatinamente, se realizó el revelado de las laminillas con 100 µL por frotis de 4-Cloro-1naftol durante 10 min.
11. Finalmente, el montaje de las laminillas se realizó con medio de montaje adicionado con DAPI (4,6-Diamino-2-Fenilindol) (Ultracruz ®Mounting Medium for Fluorescence) y se observaron mediante óptica y el marcaje con DAPI mediante microscopía de fluorescencia (microscopio marca Zeiss Axioscop 40, acoplado a una cámara Evolution VF Cooled Color de Media Cybernetics).

### 3. Método micro Bradford

1. El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pozos, por triplicado.
2. Se realizó una curva patrón utilizando una solución madre de BSA con 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en PBS-1x, a proporciones de 5  $\mu\text{L}$  de BSA y 395  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas hasta el sexto pozo.
3. La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm y se elaboró la curva estándar.
4. Para las muestras de extractos bacteriano de *P. multocida*, se colocaron alícuotas de la muestra y se llevaron a 200  $\mu\text{L}$  de reactivo, por triplicado de cada extracto y siempre colocando un pozo blanco.
5. A partir de la curva estándar se realiza el cálculo de la concentración de proteínas de la siguiente manera:
  - a. Por regresión con mínimos cuadrados se obtiene la ecuación de la curva patrón:  $\text{Concentración BSA} = a(A_{595}) + b$ .
  - b. Se calcula el coeficiente de correlación con la recta ( $r$ ).
  - c. Se realiza el gráfico y con la ecuación de la curva se calcula la concentración de proteínas en las diluciones apropiadas ( $0.1 > A_{595} < 1$ ).
  - d. Se registran por interpolación en la curva estándar los valores de la muestra, considerando la dilución y volumen de muestra en cada caso.

### 4. Técnica de ELISA indirecta

El procedimiento para el montaje de la prueba de ELISA indirecta fue el siguiente:

- 1) Se tomó 1  $\mu\text{g}$  de proteína total del extracto bacteriano de *P. multocida* y se llevó a 1 mL con solución de carbonato de sodio-bicarbonato de sodio 100 mM, con un pH de 9.6.
- 2) Adicionar 100  $\mu\text{L}$  del antígeno (Ag) por pozo, en microplacas de 96 pozos.
- 3) Se incubaron a 4° C durante 24 h.
- 4) Lavar los pozos 5 veces con solución amortiguadora de fosfatos con Tween al 0.05% (PBS-T).
- 5) Bloquear los sitios inespecíficos con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de leche descremada (Svelty) al 5% en PBS-T.
- 6) Incubar a 4°C durante toda una noche.
- 7) Lavar los pozos 5 veces con PBS-T. Posteriormente se agregaron los sueros problema comenzando con una dilución de 1:200 en PBS-1X, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de dicha dilución, estos sueros problema fueron recolectados previamente durante el desarrollo de este trabajo, se dejaron

incubar durante 2 h/ 37°C en una estufa microbiológica Brinder, previamente esterilizada.

- 8) Retirar los excedentes y lavar 5 veces con PBS-T.
- 9) Adicionar 100 µL por pozo del Ac secundario cabra anti-conejo conjugado con HRP (marca comercial Sigma) a una dilución de 1:2 000 en PBS-1X.
- 10) Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
- 11) Lavar 5 veces con PBS-T.
- 12) Adicionar 100 µL de la solución de revelado por pozo, dejar incubar durante 10 min, detener la reacción añadiendo 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 4 N por pozo.
- 13) Realizar la lectura de la placa en un lector de microplacas de ELISA (marca BioRad, modelo 550) a una longitud de onda de 490 nm.

## 5. Inclusión rápida de Robinson y Fayen

El proceso de inclusión se realizó en el siguiente orden:

1. Formol al 10-15% 5 min a 80°C, sin que presente ebullición franca.
2. Alcohol de 96%, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
3. Alcohol de 96%, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
4. Alcohol de 100%, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
5. Alcohol de 100%, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
6. Alcohol de 100% - acetona 1:1, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
7. Acetona, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
8. Acetona - xileno 1:1, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
9. Xileno, 5 min 80°C, sin que presente ebullición franca.
10. Parafina a 60°C (hasta desaparecer las burbujas), 5 min.
11. Parafina a 58°C, 5 min.
12. Incluir.

## 6. Tinción de hematoxilina eosina

1. Desparafinar e hidratar.
2. Teñir con hematoxilina de Harris durante 3 min.
3. Lavar por inmersión en cinco pases.
4. Diferenciar con alcohol ácido durante 5 min.
5. Lavar por inmersión en cinco pases.
6. Enjuagar con agua destilada.
7. Teñir con eosina, durante 1 min.
8. Deshidratar en etanol al 96%, en dos pasos.
9. Deshidratar en etanol absoluto, en dos pasos, durante 5 min cada uno.
10. Aclarar con xileno, en dos pasos durante 5 min cada uno.

11. Cubrir con medio de montaje sintético.

## 7. Tinción de azul de toluidina

1. Desparafinar e hidratar.
2. Teñir con azul de toluidina al 0.5% en agua destilada, durante 5 min.
3. Lavar por inmersión en cinco pases.
4. Diferenciar con etanol 96% durante 10 seg.
5. Diferenciar con etanol 100% durante 10 seg, en dos pases.
6. Aclarar con xileno, en dos pasos durante 5 min cada uno.
7. Cubrir con medio de montaje sintético.

## Soluciones

### 1. Preparación del revelador de ELISA

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	24.375 mL
Sustrato de ELISA	625 µL
Orto-fenilendiamina (OPD) (SIGMA)	10 mg
Peróxido de hidrógeno (SIGMA)	10 µL

### 2. Solución sustrato de ELISA

Reactivo	Cantidad
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2 M (MERCK)	6.25 mL
Ácido cítrico 0.1 M (SIGMA)	6.25 mL
Agua destilada	12.5 mL
Ajustar la solución a un pH de 5-6	

## Gráficos

1. Fig. 18. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental para los grupos con adyuvante de EAP.

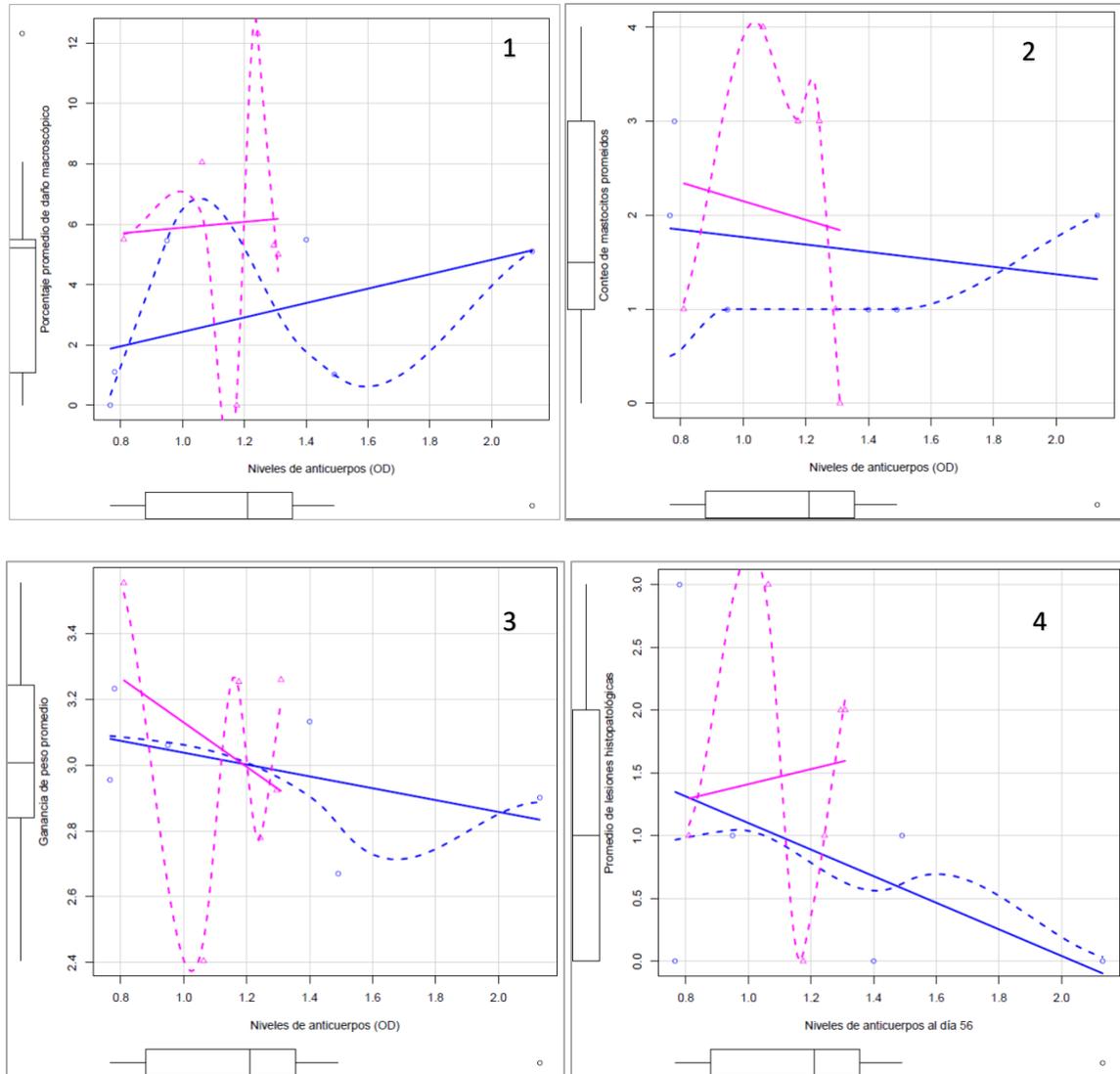


Fig. 18. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental para los grupos inmunizados con adyuvante de propóleo. 1) Correlación entre el daño macroscópico con los niveles de anticuerpos; 2) Correlación entre el conteo de mastocitos con los niveles de anticuerpos; 3) Correlación entre la ganancia de peso con los niveles de anticuerpos; 4) Correlación entre las lesiones histopatológicas con los niveles de anticuerpos. (Rosa: EAP FESC; Azul: EAP Morelos)

— Línea de mínimos cuadrados (representa la tendencia de la mayoría de los datos)

- - Línea suavizada (representa la variabilidad de los datos)

2. Fig. 19. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental para todos los grupos inmunizados.

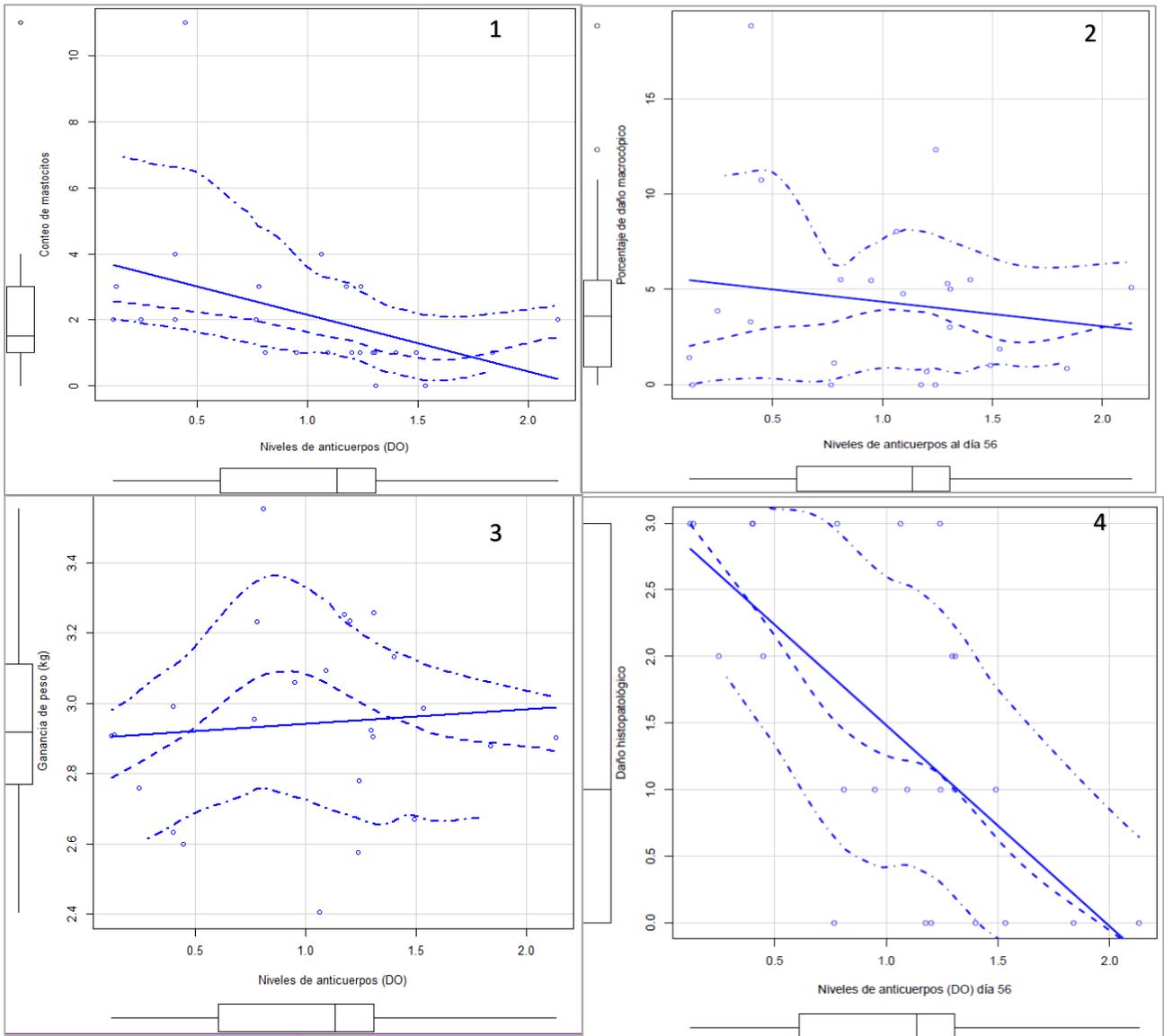


Fig. 19. Correlación entre las variables descritas con respecto al aumento del nivel de anticuerpos al día 56 experimental. 1) Correlación entre el conteo de mastocitos con los niveles de anticuerpos; 2) Correlación entre el daño macroscópico con los niveles de anticuerpos; 3) Correlación entre la ganancia de peso con los niveles de anticuerpos; 4) Correlación entre las lesiones histopatológicas con los niveles de anticuerpos.

— Línea de mínimos cuadrados (representa la tendencia de la mayoría de los datos)  
 - - - Línea suavizada (representa la variabilidad de los datos)

# Aceptación del protocolo experimental por parte de CICUAE – FESC, UNAM.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO  
DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN  
CICUAE-FESC  
OFICIO: FESC/CICUAE/11/04/2018

**TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ**  
**ACADÉMICO DE LA FES-CUAUTITLÁN**  
**P R E S E N T E**

En respuesta a las correcciones solicitadas (según oficio FESC/CICUAE/13/06/2017) por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE-FESC a su protocolo de experimentación **“Efecto inmunomodulador del propóleo en una bacterina contra Pasteurella multocida en conejos”**.

Clave CICUAE: **C 17\_12**.

El comité le notifica:

Las correcciones solicitadas fueron solventadas satisfactoriamente.

Por lo que la resolución del Comité fue **APROBAR** el presente protocolo.

Se le solicita notificar por escrito a este Comité cuando su proyecto experimental con los animales quede concluido.

Sin otro en particular, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli Estado de México a 5 de abril de 2018.  
VICEPRESIDENTE DEL CICUAE-FESC

M. en A. OLIVIA ADAMS VAZQUEZ.



C.c.p. Archivo CICUAE-FESC  
CMM/cmm



## 11. REFERENCIAS

---

1. Ahmed Mohamed SE (1985). The Ohio State University. USA. Tesis PhD: Studies of immunity to *Pasteurella multocida*; pp 25-50.
2. ACUM ([www.ancum.org.mx](http://www.ancum.org.mx)) (2016). Página oficial de la asociación nacional de cunicultores de México A. C.
3. Aguilar JC, Rodriguez EG (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, volume 25; pp 3752–3762.
4. Allison AC, Byars NE (1991). Immunological adjuvants: desirable properties and sideeffects. *Mol Immunol* 28; pp 279–284.
5. Balkovetz DF, Katz J (2003). Review: Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer. *Microb Infect* 5; pp 613-619.
6. Bankova, V., Castro, S.L., Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31; pp 3–15.
7. Bernard, A. and G. Muller (1995). Occurrence of T lymphocytes in perivascular regions of the lung after intratracheal infection of swine with *Pasteurella multocida*. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 49; pp 143-159.  
[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05457-H](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05457-H)
8. Bogdanov S. (2014). Propolis, composition, health, medicine: a review. *Bee Product Science*; pp 1-21.
9. Bottasso O (2016). Inmunología molecular, celular y traslacional. Editorial Wolters Kluwer (Ed), *Respuesta inmunológica a bacterias*, Barcelona; pp. 434-447.
10. Boyce J, Lo C, Wilkie I, Adler B. (2004). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Edition 3<sup>ra</sup>. Chapter 20; pp 75-200.
11. Boyce J, Adler B. (2000). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B2). *Infec Immun*, 68; pp 3463-3468.
12. Burdock, George (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 36; pp 347-63 | DOI: 10.1016/S0278-6915(97)00145-2.
13. Cameron CM, Engelbrecht MM, Vermeulen AS. (1978). The serological and immunological relationship of types strains A and D of *Pasteurella multocida* to field isolates from sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 45; pp 215–220.
14. Caroff M, Karibian D, Cavaillon J, Haeffner-Cavaillon N. (2002). Forum in immunology: structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 4; pp 915 – 926
15. Cervantes García AB y Aguilar Romero F (2016). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México. Tesis Maestría: *Elaboración de un biológico para la prevención de pasteurelisis en conejos*; pp 7-42.  
[http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc\\_library=TES01&doc\\_number=000750551&line\\_number=0001&func\\_code=WEB-BRIEF&service\\_type=MEDIA](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc_library=TES01&doc_number=000750551&line_number=0001&func_code=WEB-BRIEF&service_type=MEDIA)
16. Cruz Sánchez Tonatiuh, Martínez Robles S. Sandra, Garrido Fariña Germán, Tórtora Pérez Jorge, et al. (2008), *In situ* analysis of CD4, CD8 and mast cell in

- lung of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimentally infected pigs. Journal of animal and veterinary advances 7 (6); pp 752 – 758.  
<http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2014.410028>.
17. Deeb BJ, DiGiacomo RF. (2000). Respiratory diseases of rabbits. Vet Clin North Am Exotic Anim Pract. May; 3(2); pp 465-480. PMID: 11228889.
  18. De Navarro Yolanda, Cortés A. Gerardino, Rojas Milver, Robin Oscar. (1992). Estudios de aislamiento y fraccionamiento de un complejo glicoproteico de *Pasteurella multocida*. Revista colombiana de química, Bogotá (Colombia), Volumen 21, Nos. 1-2.
  19. De Oliveira, E. M. (2000). Ambiente y productividad en cunicultura. Lagomorpha. Revista de la Asociación Española de Cunicultura (110); pp 21-25.
  20. Dubey, G. P., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. Cell, 144(4); pp 590-600 | DOI:10.1016/j.cell.2011.01.015
  21. El Ashry E, Ahmad T. (2012). The use of propolis as vaccine's adjuvant. Vaccine 31; pp 31– 39.
  22. Ewers C., Lübke-Becker A., Kiebling S., Kiebling S., Filter M., Wieler LH. (2006). Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol 31;114(3-4); pp 304-17 | PubMed PMID: 16427218.
  23. Fan Y, Ma L, Zhang W, Wang Y, Chen Y, Gao Y, Feng W, Zhong L, Song X. (2014). The design of propolis flavone microemulsion and its effect on enhancing the immunity and antioxidant activity in mice. International Journal of Biological Macromolecules 65; pp 200–207.
  24. Fischer Geferson (2006). Inmunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with Su HV-1. Departamento de microbiología e inmunología, Instituto de Biociencias; pp 1250-1256.
  25. Fischer Geferson, Brum Cleff Marlete, et. al., (2007). Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5; pp 173-188.
  26. Franchin, Marcelo, Colón David F (2016). Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. Scientific Reports. Nature. 6:36401 | DOI: 10.1038/srep36401.
  27. Flores Anaya Liliana y Cruz Sánchez Tonatiuh et al. (2004). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. Tesis licenciatura: *Diagnóstico de neumonía enzootica en granjas del Estado de México mediante las técnicas de planimetría, análisis digitalizado de imagen, inmunofluorescencia y aislamiento e identificación de Mycoplasma hyopneumoniae*; pp 13-35.  
<http://132.248.9.195/ptd2009/junio/0645398/Index.html>
  28. García-Alvarez A, Chaves F, Fernández A, Sanz C, Borobia M, Cid D. (2015) An ST11 clone of *Pasteurella multocida*, widely spread among farmed rabbits in the Iberian Peninsula, demonstrates respiratory niche association. Infect Genet Evol | DOI: 10.1016/j.meegid.2015.07.018 | PMID: 26192377.

29. Gavidia Giovana, Cerrolaza Miguel, Oñate Eugenio (2009). Desarrollo de una herramienta de procesamiento de imágenes Médicas en MATLAB y su Integración en Medical GiD. CIMNE Barcelona. Innovadores de Tecnología para la Salud; pp 4 – 5.
30. Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: a review. *Bee World*; pp 59–84.
31. Giral T., Hugues B., et al., (2007). Suspensión oftálmica de propóleos: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en animales afectivos; pp 2-5.
32. Gragette C, Müller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M & Mercenier A. (2004). Enhanced mucosal delivery of antigen with cell Wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect. Immun* 72; pp 2731-2737.
33. Gutiérrez Elisa y Cruz Sánchez Tonatiuh (2015). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. Tesis Maestría: *Propóleos mexicanos: perfil químico y actividad antibacteriana sobre cepas de Pasteurella multocida aislada de conejos*; pp 20-50.  
[http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc\\_library=TES01&doc\\_number=000672994&line\\_number=0001&func\\_code=WEB-BRIEF&service\\_type=MEDIA](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/?func=service&doc_library=TES01&doc_number=000672994&line_number=0001&func_code=WEB-BRIEF&service_type=MEDIA)
34. Gutiérrez Pabello, José Angel (2010). *Inmunología veterinaria*. México: Editorial El Manual Moderno 17; pp 219-220.
35. Harper M, Boyce J, Adler B. (2006). Minireview: *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* (265); pp 1-10.
36. Jaglic Z., Kuceracova Z., Nedbalcova K., Hlozek P., Bartos M. (2004). Identification of *Pasteurella multocida* serogrup F isolates in rabbits. *Veterinary research institute, Brno, Czech Republic*. Volume 51, Issue 10; pp 467-469:  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00807.x>
37. Kubatzky, K. F., Kloos, B., & Hildebrand, D. (2013). Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins*, 5(9), pp 1664–1681 | DOI:10.3390/toxins5091664.
38. Kumar Sujeet, K. C. V., Kumar Bablu, Kumar Pankaj, Rani Somarajan Sudha, Kumar Mishra Anil, Sharma Bhaskar. (2015). Effect of alum co-adjuvantation of oil adjuvant vaccine on emulsion stability and immune responses against haemorrhagic septicaemia in mice. *Iranian Journal of Microbiology*, Volume 7 Number 2; pp 79-87.
39. Lazzari Rafael, Mombach Patricia Inés, et al. (2011). Evaluación del propóleo como promotor del crecimiento en la carpa común (*Cyprinus carpio*). *Revista científica en línea XXI* (septiembre-octubre); pp 5-7.
40. Licea Vega José Antonio, Mendoza Saavedra Marco Antonio, et al., (2016). *Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Manual de prácticas: *Inmunología veterinaria*; pp 142 - 154
41. López R., R. Chávez, D. L. y Ecoabar, H.J. (1991). Métodos de Investigación en Biología Experimental II. CINVESTAV – IPN: pp 20-102.
42. Marcucci (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Biological Chemistry Laboratory, Brazil*. *Apidologie* 26; pp 83-99; <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>.
43. Martins RS, Péreira ES Jr, Lima SM, Senna MI, Mesquita RA, Santos VR. (2002). Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative

- Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci*, Mar; 44 (1); pp 41-48 | PubMed PMID: 12058869.
44. Martínez-Florez, González-Gallego et al., (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España. *Nutrición Hospitalaria*; pp 2-5.
  45. Martínez Covarrubias, Adriana Guadalupe, Santillán Flores, Marco Antonio, Guzmán Ruiz, Claudia Celic, Favila Humara, Lucía del Carmen, Córdova López, Dionicio, Díaz Aparicio, Efrén, Hernández Andrade, Laura, & Blanco Ochoa, Miguel Ángel (2012). Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*,3(1); pp 1-18.
  46. Marrack Philippa, McKee Amy S. and Munks Michael W. (2009). Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature reviews of Immunology*. Volume 9; pp 287 – 293.
  47. Massacci Romana Francesca, Francesca Magistrali Chiara, Cucco Lucilla, Curcio Ludovica, Bano Luca, Mangili PierMario, Scoccia Eleonora, Bisgaard Magne, Aalbaek Bent, Christensen Henrik (2018). Characterization of *Pasteurella multocida* involved in rabbit infections. *Veterinary Microbiology Elsevier* Volume 213; pp 66-72.
  48. Mani F Damasceno HCR Novelli ELB Martins EAM and Sforcin JM., (2006) Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology*, 105; pp 95–98.
  49. Miguel, M. G., & Antunes, M. D. (2011). Is propolis safe as an alternative medicine?. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(4), pp 479–495 | DOI:10.4103/0975-7406.90101
  50. Missima and Sforcin (2007). Green Brazilian Propolis Action on Macrophages and Lymphoid. *Brasil*; pp 95-97.
  51. Montaraz Crespo Juan Antonio (2012), *Inmunología 2ª Edición*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 19; pp 90-95.
  52. Montalvo Arenas César Eduardo (2010). *Técnica histológica*; pp 1-2
  53. Muñoz R, Linares V., Narváez S., (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Revista Biosalud*, Volumen 10 No. 2; pp 53-59.
  54. Nassar Somya A, Mohame Amira H. et al., (2012). Inmunostimulant effect of Egyptian propolis in rabbits. *ScientificWorldJournal*; pp 1-5.
  55. Norma Oficial Mexicana (NOM-003-SAG/GAN-2017) (2017). Especificaciones de producción, características físicas, químicas y antimicrobianas, que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país. México: Autor.
  56. Norma Oficial Mexicana (NOM-049-ZOO-1995) (1997). Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelosis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D. México: Autor; pp 1-32.
  57. Norma Oficial Mexicana (NOM-063-ZOO-1999) (2003). Especificaciones que deben cumplir los biológicos empelados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. México: Autor; pp 1-22.

58. Pazmiño, F., & Navarrete-Jiménez, M., (2014). Mecanismos inmunológicos implicados en la patología del asma alérgica. *Revista de la Facultad de Medicina*, 62(2); pp 265-277 | <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v62n2.45417>
59. Pérez Torres Berenice Xochiquetzal, Canales Martínez María Margarita et al., (2013). Tesis Maestría: *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los propóleos mexicanos contra cepas de Pasteurella multocida de origen porcino*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM; pp 1-3.
60. Pino Yadira, Valmesada Tania, Medina Yudisey, Cedré Bárbara, et al., (2003). Validación de un ensayo ELISA para determinación de anticuerpos anti LPS de *Vibrio cholerae*. Instituto Finlay. *VacciMonitor* No 1; pp 1-5.
61. Quiroz Martínez Miguel Ángel (2007). *Pasteurellosis neumónica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; pp 3.
62. Rodríguez Morales Roberto, Sossa Azuela Juan Humberto (2011). *Procesamiento y análisis digital de imágenes*. RA-Ma Editorial; pp 5-9
63. Rosell, J. M. (2000) *La investigación en cunicultura*. En enfermedades del Conejo. Tomo I Generalidades. Ed J. M. Rosell. Barcelona, Mundi-Prensa. México: Autor, pp 52-54.
64. Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2; pp 33–38.
65. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pasca y alimentación. (SAGARPA) (2018). *Boletín informativo: Producción de carne de conejo en el Estado de México: ciclo 2017*. México: Autor.
66. Selva, L.; Viana, D.; Ortega, J. y Corpa, J.M. (2007). *Revisión Bibliografía. Pasteurellosis: principal patología respiratoria en cunicultura industrial*. Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia. *Boletín de cunicultura*. No. 150; pp 14-24
67. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SNSCA) (2009). *Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina*. Laboratorio de referencia de la OIE para brucelosis. Coordinación general de laboratorio animal. Dirección de laboratorio y control técnico: Argentina: Autor, pp 2-6.
68. Sforcin J. M. (2016). Propolis and the immune system: a review. Departamento de microbiología e inmunología. Instituto de Biociencias, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; pp186-200.
69. Sforcin, J.M., Orsi, R.O., Bankova, V. (2005). Effects of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology* 98; pp 301–305.
70. Singh, S., Singh, V. P., Cheema, P. S., Sandey, M., Ranjan, R., Gupta, S. K., & Sharma, B. (2011). Immune response to dna vaccine expressing transferrin binding protein a gene of *Pasteurella multocida*. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology, 42(2); pp 750-60.
71. Suckow MA. (1995). Protective immunity to *Pasteurella multocida* heat-labile toxin by intranasal immunization in rabbits. *Lab Anim Sci*, 45; pp 526-532.

72. Suckow, M. A., Haab, R. W., Miloscio, L. J., & Guilloud, N. B. (2008). Field trial of a *Pasteurella multocida* extract vaccine in rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 47(1): pp 18-21.
73. Trejo Falcon, et al. (2015). Prueba de ganancia de peso y conversión alimenticia en conejos con un alimento suplementado con productos de la colmena. México; pp 3-5.
74. Torres Alvarado Rocío, Calva L. Georgina (2002). Compuestos fenólicos: origen, distribución y efectos en los ecosistemas marinos. *Lab. Ecosistemas Costeros*. Depto. Hidrobiología; pp 5-6.
75. Torres-Ruíz José J., Martín-Nares Eduardo, López-Íñiguez Alvarado (2016). Síndrome autoinmune/autoinflamatorio inducido por adyuvantes (ASIA). *Revista Médica MD*, 7(3): pp 170-181.
76. Tovar Betancourt, Nelly & Cruz Sánchez Tonatiuh (2016). Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis maestría: Evaluación antimicótica in vitro del propóleo mexicano sobre *Malassezia pachydermatis*, pp 40-42.  
<http://132.248.9.195/ptd2016/noviembre/0753315/Index.html>
77. Townsend K, Boyce J, Chung J, Frost A, Adler B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 39(3); pp 924-929.
78. Wilson, B. A., & Ho, M. (2013). *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), pp 631–655 |DOI:10.1128/CMR.00024-13
79. Yolanda de Navarro, G. C. A., Milver Rojas y Oscar Robin (1992). Estudios de aislamiento y fraccionamiento de un complejo glicoproteico de *Pasteurella multocida*. *Revista Colombiana de Química*, Bogota (Colombia), 21(Nos 1-2), pp 63-74.
80. Zhang B, Wang D, Kong X, Hu Y. (2006). Studies on immunoenhancement of propolis flavone. *Yangzhou Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban*. 27: pp 2-20.