

## El factor de transferencia como inductor de la expresión de RNAm de IFN- $\gamma$ e IL-2 en pollos vacunados contra influenza aviar<sup>#</sup>

Transfer factor acting as IFN- $\gamma$  and IL-2 mRNA expression inductor in chicken vaccinated against avian influenza

A Bravo-Blas<sup>a</sup>, R Téllez<sup>a</sup>, S Uribe<sup>a</sup>, F Salmerón<sup>a</sup>, L Valdés<sup>a</sup>, S Estrada-Parra<sup>b</sup>, L Cobos-Marín<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

<sup>b</sup>Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Colonia Santo Tomás, México D.F., México.

### SUMMARY

Avian influenza is a disease of paramount economical importance for the poultry industry. In Mexico, only low pathogenicity H5N2 strain has been reported and it is controlled through inactivated-virus inoculation. This emulsified vaccine reduces clinical signs indeed, but not viral shedding. Over the last 50 years Transfer Factor (TF) has shown to be an efficient immunomodulator and has been used successfully in human clinical cases, and less commonly in animal models. The aim of this work was to establish an avian influenza-specific TF dose able to produce the highest percentage of mRNA expression of the following cytokines: IL-2 and IFN- $\gamma$ . An experiment to show the mRNA expression of these cytokines in chicken previously inoculated with avian influenza-specific TF was set up. In the first experiment 0.1, 1 and 10 TF units were inoculated into 3 different groups of chickens; PCR for cytokines from splenic tissue was performed. For the second experiment, a second TF inoculation in combination with the vaccine was carried out using 3 new groups of chicken. Experiment 1: Only IL-2 expression was achieved in 58.33% of chickens using 1 TF unit ( $P < 0.05$ ). In experiment 2, 75% of chickens showed IL-2 with 1 TF unit ( $P < 0.05$ ) and all of them (100%) expressed IFN- $\gamma$  ( $P < 0.01$ ). From these results it can be concluded that IFN- $\gamma$  and IL-2 expression can be induced by the inoculation of 1 TF unit (equivalent to 7.3  $\mu\text{g}$  of protein) at the beginning of the experiment procedure and after a second inoculation of TF (10 days after) together with the inactivated virus vaccine.

*Palabras clave:* extractos dializables de leucocitos, citocinas, respuesta inmune celular, PCR.

*Key words:* dialyzable leukocyte extracts, cytokines, cellular immune response, PCR.

### INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se han presentado varios brotes de influenza aviar (IA) en diferentes países del mundo (Naeem y Hussain 1995, Röhm y col 1996, Muhammad y Muneer 1997, Capua y Marangon 2000). La IA es una enfermedad de gran importancia económica para la industria avícola, que puede manifestarse clínicamente en el caso de las cepas de baja patogenicidad, ya sea afectando el tracto respiratorio, reproductivo o urinario o, en caso de las cepas altamente patógenas, provocando un cuadro sistémico (Swayne y col 1999) y mortal (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural 1995). Para mantener el control de la enfermedad en nuestro país se emplean regularmente vacunas inactivadas, que, si bien reducen el cuadro clínico en caso de brote, no evitan la diseminación del virus, lo que genera mayor probabilidad de que éste circule entre las parvadas y mute a sus formas de alta patogenicidad. Debido a esto es necesario

el desarrollo de inmunomoduladores eficientes y de fácil acceso para la industria avícola nacional, que permitan mejorar la respuesta a la infección y disminuyan la diseminación del virus.

El Factor de Transferencia (FT), también conocido como extracto dializable leucocitario (DLE), fue descrito por primera vez por Sherwood Lawrence (Lawrence 1949). Éste es un conjunto de proteínas de bajo peso molecular (Kirkpatrick 2000), obtenidas de leucocitos de donadores sanos o previamente inmunizados y ha sido ampliamente utilizado debido a su capacidad para transferir una respuesta inmunocelular en forma antígeno específica en receptores no inmunes, así como por su efecto inmunomodulador al incrementar la cantidad de células inmunocompetentes, estimular fagocitosis y hematopoyesis, además de inducir la producción de citocinas como la interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y TNF $\alpha$  (Álvarez-Thull y Kirkpatrick 1996, Calzada 2000, Fabre y col 2004, Ojeda y col 2005). Otros efectos de estos extractos y caracterizaciones parciales han sido descritos por los mismos en Lawrence y Borkowsky (1983) y Kirkpatrick (1993).

En humanos se ha usado en la protección y el control de diversas enfermedades (Berrón y col 2007), de etiología viral (Padierna y col 1985, Pizza y col 1996), bacterianas

Aceptado: 23.09.2009.

<sup>#</sup> Financiado por PAPIIT IN226005.

\* lcobos1@hotmail.com

(Bullock y col 1972, Estrada-Parra y col 1983, Franco-Molina y col 2004), parasitarias (Delgado y col 1981), inmunomediadas (García-Ángeles y col 2003, Flores y col 2005) y degenerativas (Pineda y col 2005); mientras que en medicina veterinaria ha sido empleado en la prevención de algunas enfermedades en suinos (Rojas 1987, Torres 1994, Calzada 2000), aves (Klesius y Giambrone 1984, Wilson y col 1988) y bovinos (Mateos 1992).

En los últimos 20 años ha quedado claro que la regulación de la respuesta inmunitaria y otras funciones inmunes dependen de un pequeño número de citocinas; dos de ellas, la IL-2 y el IFN- $\gamma$ , son de gran importancia en la respuesta inmune celular mediada por linfocitos 1 (LTH1) y 2 (LTH2) y linfocitos T citotóxicos, particularmente en las infecciones virales.

El objetivo de este trabajo fue determinar, mediante la técnica de PCR, la expresión del RNAm de IL-2 e IFN- $\gamma$  en bazos de aves tratadas con tres diferentes dosis del FT aviar (FT), antes y después de aplicar una vacuna inactivada de influenza aviar en emulsión, con la finalidad de establecer la dosis de FT capaz de mejorar la respuesta inmune celular en aves al inducir la expresión de estas citocinas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El Factor de Transferencia Aviar (FT) se elaboró a partir de 10 bazos de pollos machos de la línea Ross, clínicamente sanos, vacunados contra la enfermedad de Marek y de 30 días de edad. Los animales se inmunizaron con virus de IA cepa A/Chicken/Hidalgo/H5/1995 inactivada con formol al 0,5%, a los 15, 20 y 25 días de edad (por vía subcutánea) y sacrificados por dislocación cervical cinco días después para obtener sus bazos. Los bazos fueron procesados según lo descrito por Fabre y col (2004), éstos se maceraron con malla de aluminio y 30 mL de solución salina isotónica (NaCl 0,85%); el macerado se sometió a 10 ciclos de congelación-descongelación (a -70 °C y 37 °C) y se dializó por centrifugación a 5000 g (centrífuga Legend modelo Mach 1.6 R) en tubos Amicon<sup>1</sup> Ultra-15 con corte de 10 KDa. El dializado se esterilizó por filtración con una membrana de 0,22  $\mu$ m y se fraccionó en tubos de 1 mL. Se estableció como una unidad de FT el producto extraído a partir de 4 x 10<sup>6</sup> células y éste se cuantificó con el micrométodo del ácido bicínico (BCA) según especificaciones del proveedor. El equivalente en proteínas de una unidad de FT fue 7,3 g.

El resto del estudio se realizó en dos experimentos:

### EXPERIMENTO 1

Evaluación de la respuesta de las citocinas al tratamiento con FT exclusivamente:

Se utilizaron 68 pollos machos, línea Ross, alimentados *ad libitum*, clínicamente sanos, de 10 días de edad, que se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 16 pollos. Del grupo 1 al 3 fueron inoculados con 0,1, 1 y 10 unidades (U) de FT en 0,2 mL, respectivamente, por vía subcutánea, y el grupo 4, que funcionó como testigo, fue inoculado con 0,2 mL de solución salina fisiológica (SSF) por la misma vía. Posteriormente se obtuvieron los bazos de 4 pollos por grupo a los 4, 7 y 10 días después de aplicar el FT.

### EXPERIMENTO 2

Evaluación de la respuesta de las citocinas al tratamiento con FT y vacuna inactivada de influenza aviar en emulsión. Los cuatro animales restantes de cada grupo, se inocularon diez días después con las mismas dosis del FT por vía intradérmica y con 0,5 mL de vacuna por vía subcutánea y siete días después se obtuvieron los bazos correspondientes. Se incluyó un grupo testigo que sólo recibió la vacunación.

### EXTRACCIÓN DE RNA

Se maceraron 80 mg de tejido esplénico por animal y se almacenaron en 500  $\mu$ L de Trizol<sup>2</sup> a -20 °C hasta su uso. La extracción de RNA se realizó con Trizol de acuerdo con el protocolo comercial.

El RNA obtenido se transcribió a DNA complementario (DNAc) usando una transcriptasa inversa MMLV-RT<sup>3</sup> mediante el siguiente protocolo: A 3  $\mu$ g de RNA contenidos en 13  $\mu$ L de agua dietil pirocarbonato (DEPC), se añadieron 2  $\mu$ L del oligo dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L), se incubó a 65 °C/10 min y posteriormente a 4 °C/5 min. Se agregaron 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción (agua DEPC, 6  $\mu$ L solución amortiguadora 5X, 200 U M-MLVRT, 1,2  $\mu$ L dNTP's 400  $\mu$ M, 3  $\mu$ L DTT 100 mM) y se incubó a 37 °C/1 hora y a 95 °C/5 min; terminada la reacción se centrifugó 5 segundos y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua DEPC. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L con 2,5  $\mu$ L de DNAc, 0,05 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 M de dNTP's, 0,2 M de iniciador  $\beta$ -actina 5' (CCC TGA AGT ACC CCA TTG AAC ACG) e iniciador  $\beta$  actina 3' (CCT CGG GGC ACC TGA ACC TCT) y 1U de *Taq* polimerasa, en las siguientes condiciones de amplificación: 30 ciclos de 94 °C/45 seg, 60 °C/45 seg, 72 °C/90 seg y 1 ciclo de 72 °C/7 min (termociclador marca Techne TC-312).

Los productos de las PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% que se tiñó con bromuro de etidio. Una vez obtenida la banda correspondiente al gen constitutivo ( $\beta$ -actina) se procedió a realizar la PCR para ambas citocinas. Para IL-2 se utilizaron las condiciones de amplificación

<sup>1</sup> Cat No. UFC901096. Amicon Ultra. Millipore.

<sup>2</sup> Invitrogen Cat. No. 155596-018.

<sup>3</sup> Invitrogen Life Technologies. Cat. No. 15596026.

y los iniciadores F: AGT GTT ACC TGG GAG AAG T y R: TTA CCG ACA AAG TGA GAA TC descritos por Loza (2003) en un volumen de 25  $\mu$ L con 2,5  $\mu$ L de DNAC, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTP's, 0,8  $\mu$ M de cada iniciador, gelatina molecular al 0,001% y 1U de *Taq* polimerasa; para IFN- $\gamma$  se emplearon las condiciones y los iniciadores F: GTG AAG AAG GTG AAA GAT ATC ATG GA y R: GCT TTG CGC TGG ATT CTC A citados por Rothwell (Rothwell y col 2004) en un volumen de 25  $\mu$ L con 2,5  $\mu$ L de DNAC, 2mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTP's, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador y 1U de *Taq* polimerasa. Posteriormente se registraron y contabilizaron los resultados de las expresiones, como presencia y ausencia de la banda correspondiente a cada citocina.

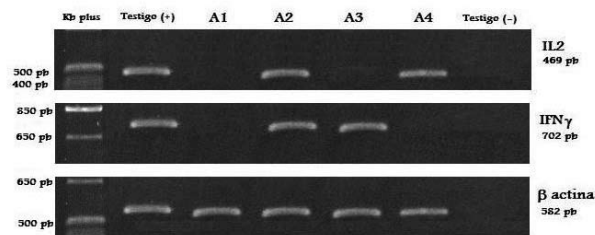
#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De estas frecuencias, se realizó la prueba de Ji-cuadrada de homogeneidad y la prueba exacta de Fisher.

#### RESULTADOS

En la figura 1 se presenta un ejemplo de las bandas obtenidas con los distintos iniciadores. Todas las muestras fueron positivas al gen constitutivo ( $\beta$ -actina) al amplificar el producto esperado de 582 pb; mientras que solo en algunas de las muestras se amplificaron los productos de IL-2 (469 pb) e IFN $\gamma$  (702 pb).

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de bazos en los que se detectó la expresión del RNAm de IL-2 correspondiente al experimento 1, donde se observó diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en la distribución de las frecuencias entre tratamientos. En el tratamiento 1 (0,1 unidades) el 25% de los animales fue positivo; en el tratamiento 2 (1 unidad), el 58,33% fue positivo y en el tratamiento 3 (10 unidades) el 100% resultó negativo. Para el tratamiento 4 (SSF) el 25% resultó positivo.



**Figura 1.** Ejemplo de los productos amplificados por PCR de las muestras de bazos. Bandas correspondientes a IL-2, IFN- $\gamma$  obtenidos de pollos estimulados con FT y vacunados contra influenza aviar.

Example of PCR product amplification in spleen samples. IL-2, IFN- $\gamma$  mRNA and  $\beta$ -actin expression obtained from TF stimulated and avian influenza vaccinated chicken.

Con respecto a IFN- $\gamma$  la prueba no detectó una diferencia significativa ( $P > 0,05$ ), por lo que todos los tratamientos fueron iguales respecto a la distribución de positivos y negativos a la expresión de IFN- $\gamma$ . No se observaron diferencias entre los tiempos de obtención del bazo (4, 7 y 10 días) postratamiento, por lo que en el experimento 2 se obtuvieron únicamente al día 7 postratamiento.

En el cuadro 2 se observan los porcentajes de expresión del RNAm de las citocinas que corresponden al experimento 2. Se encontró diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) en la distribución de las frecuencias de casos positivos de expresión de IL-2 entre tratamientos donde se muestra que fue el tratamiento 5 (solo vacuna) en el

**Cuadro 1.** Porcentaje de bazos con expresión positiva del RNAm para IL-2 e IFN- $\gamma$  obtenidos de aves estimuladas con tres diferentes dosis de FT.

Percentage of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA expression in spleens obtained from previously TF stimulated chicken using three different dosages.

| Grupo | Tratamiento | Dosis (Unidades) | Positivos % |               |
|-------|-------------|------------------|-------------|---------------|
|       |             |                  | IL-2        | IFN- $\gamma$ |
| 1     | FT          | 0,1              | 25,00*      | 58,33         |
| 2     | FT          | 1,0              | 58,33*      | 33,33         |
| 3     | FT          | 10,0             | 0,00*       | 75,00         |
| 4     | Placebo     | –                | 25,00*      | 66,67         |

\* Diferencia significativa en los tratamientos para la expresión de IL-2 ( $P < 0,05$ )

\* Significant difference among treatments for IL-2 expression ( $< 0,05$ ).

**Cuadro 2.** Porcentaje de bazos con expresión positiva de IL-2 e IFN- $\gamma$  obtenidos de aves estimuladas con FT y vacuna contra influenza aviar.

Percentage of IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA expression in spleens obtained from TF stimulated chicken and avian influenza vaccination.

| Grupo | Tratamiento | Dosis (Unidades) | Positivos % |               |
|-------|-------------|------------------|-------------|---------------|
|       |             |                  | IL-2        | IFN- $\gamma$ |
| 1     | FT+Vacuna   | 0,1              | 0,00*       | 100,00†       |
| 2     | FT+Vacuna   | 1                | 75,00*      | 100,00†       |
| 3     | FT+Vacuna   | 10               | 75,00*      | 25,00†        |
| 4     | Placebo     | –                | 25,00*      | 0,00†         |
| 5     | Sólo Vacuna | –                | 100,00*     | 25,00†        |

\* Diferencia significativa en los tratamientos para expresión de IL-2 ( $P < 0,05$ ).

† Diferencia altamente significativa en los tratamientos para expresión de IFN- $\gamma$  ( $P < 0,01$ ).

\* Significant difference among treatments for IL-2 expression ( $P < 0,05$ ).

† Highly significant difference among treatments for IFN- $\gamma$  expression ( $P < 0,01$ ).

que se observó la mayor frecuencia de casos positivos (100%), seguido por los tratamientos 2 y 3, ambos con 75% de casos de expresión positiva para IL-2.

En lo que corresponde a la expresión de IFN- $\gamma$  también se observó diferencia significativa ( $P < 0,01$ ) y en los resultados se puede ver que sobresalen los tratamientos 1 y 2 con 100% de casos positivos a la expresión de dicha citocina, mientras que la vacuna solo indujo la expresión de esta citocina en un animal.

## DISCUSIÓN

En este estudio se observó que al aplicar una unidad de FT (equivalente a 7,3  $\mu\text{g}$  de proteína) al inicio del experimento y 10 días después otra unidad de FT junto con una vacuna inactivada de influenza aviar se aumentó el porcentaje de animales que expresaron el RNAm de IFN- $\gamma$  (100%) e IL-2 (75%) con respecto a la vacuna sola (25%) y al placebo.

En mamíferos el IFN- $\gamma$  es reconocido como una importante citocina con efecto pleiotrópico, producida tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa; su papel en la protección hacia infecciones virales ha sido ampliamente estudiado y se sabe que participa en la activación de células NK, neutrófilos y macrófagos (Samuel 2001), incrementa la presentación de antígenos virales, activa linfocitos T citotóxicos, favorece el perfil TH1, la producción de anticuerpos (Yilma y col 1989, Stark y col 1998, McCormick y col 2001, Schijns y col 2002) y el cambio de isotipo a IgG2 (Snapper y Paul 1987, De Wit y col 2004). El papel del IFN- $\gamma$  como inmunomodulador también ha sido estudiado en aves: Lowenthal demostró que si se administra como adyuvante junto con eritrocitos de carnero la respuesta de anticuerpos se incrementa diez veces (Lowenthal y col 1998); en la respuesta a microorganismos se ha asociado a protección en aves infectadas con la enfermedad de Marek (Kaiser y col 2003) y se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  recombinante disminuye la carga parasitaria en pollos desafiados con *Eimeria* (Lillehoj y Choi 1998). Por su parte la IL-2 es una citocina importante ya que favorece la proliferación de linfocitos T y B, e induce a las células fagocíticas a producir citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la IL-8; en un estudio en aves se demostró que la IL-2 recombinante aplicada antes de la estimulación antigénica con *Salmonella* indujo la expresión *in vitro* de citocinas proinflamatorias (IL-8) y del perfil TH1 (IL-18) (Kogut y col 1998).

Hasta donde se pudo investigar, no se encontraron reportes sobre la dosis efectiva del FT en aves; en otros estudios realizados en diferentes especies se ha establecido la dosis dependiendo del número de células obtenidas en la suspensión linfocitaria antes de romperlas (Fabre y col 2004). Para la presente investigación se decidió determinar la dosis con la cuantificación de proteínas del producto ya dializado por considerarla una forma más sencilla y exacta que la cuenta linfocitaria. En este trabajo se estableció 1 unidad de FT (equivalente a 7,3  $\mu\text{g}$ ) como

la dosis efectiva en pollos ya que a esta dosis se indujo el mayor porcentaje de expresión del RNAm de IL-2 en el experimento 1 y del RNAm de IFN- $\gamma$  e IL-2 en el experimento 2. Las otras dos dosis de FT (0,1 y 10 unidades) evaluadas en ambos experimentos no resultaron tan efectivas, ya que el porcentaje de animales que expresaron el mensajero para estas proteínas fue menor; por otra parte, se observó que el FT aplicado sin el estímulo antigénico (experimento 1) no moduló la expresión de IFN- $\gamma$  en ninguna de las dosis probadas con respecto al testigo negativo; esto pudo ocurrir debido a que los animales presentaron una expresión basal de dicha citocina, por lo que ésta ya no se modificó de una manera significativa o bien porque es necesaria la presencia del antígeno para modular la expresión de IL2 *in vivo*. En otros estudios se ha observado el aumento de IFN- $\gamma$  en ratones cursando una infección crónica con tuberculosis o infectados con herpes virus simple y tratados con FT (Álvarez-Thull y Kirkpatrick 1996, Fabre y col 2004).

Debido a su disponibilidad, bajo costo y al hecho de que el FT aumenta la expresión del RNAm de IFN- $\gamma$  e IL2, se sugiere incluirlo en la formulación de la vacuna inactivada contra IA para evaluar si coadyuva a mejorar los niveles de protección y disminuir la excreción viral, lo que contribuiría a un mejor control de la enfermedad.

## RESUMEN

La influenza aviar es una enfermedad de gran importancia económica para la industria avícola. En México sólo se ha reportado la cepa H5N2 de baja patogenicidad y ésta se controla mediante la vacunación con virus inactivado. Esta vacuna en emulsión reduce la presencia de signos, pero no la eliminación viral. Desde hace más de 50 años se ha informado acerca de la eficacia del Factor de Transferencia (FT) como inmunomodulador en casos clínicos humanos y en menor cantidad en modelos animales. El objetivo de este trabajo fue el de establecer la dosis que produce un mayor porcentaje de expresión del RNAm de dos citocinas: IL-2 y de IFN- $\gamma$ . Se diseñó un experimento para evidenciar la expresión del RNAm de estas dos citocinas en pollos previamente inoculados con FT específico para influenza aviar. En la primera fase se aplicaron 0,1, 1, y 10 unidades de FT a diferentes grupos de pollos, posteriormente se realizó la PCR a partir de tejido esplénico. En la segunda fase se aplicó el FT junto con la vacuna a tres nuevos grupos de pollos. Del experimento 1 solamente IL-2 tuvo un porcentaje mayor de positivos (58,33%) con 1 unidad ( $P < 0,05$ ). En cambio, en el experimento 2, con 1 unidad se obtuvo 75% de positivos para IL-2 ( $P < 0,05$ ) y 100% para IFN- $\gamma$  ( $P < 0,01$ ). De estos resultados se puede concluir que al aplicar una unidad de FT (equivalente a 7,3  $\mu\text{g}$  de proteína) al inicio del experimento y 10 días después otra unidad de FT junto con la vacuna inactivada de IA se indujo la expresión del RNAm de IFN- $\gamma$  e IL-2.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió financiamiento del PAPIIT IN226005.

## REFERENCIAS

- Álvarez-Thull L, H Kirkpatrick. 1996. Profiles of cytokine production in recipients of transfer factors. *Biotherapy* 9, 55-59.
- Berrón-Pérez R, R Chávez-Sánchez, I Estrada-García, S Espinosa-Padilla, R Cortez-Gómez, E Serrano-Miranda, R Ondarza-Aguilera, M Pérez-Tapia,

- B Pineda-Olvera, MC Jiménez-Martínez, A Portugués, A Rodríguez, L Cano, P Urcino-Pacheco, J Barrientos, R Chacón, J Serafín, P Méndez, A Monges, E Cervantes, S Estrada-Parra. 2007. Indications, usage, and dosage of the transfer factor. *Rev Alerg Mex* 54, 134-39.
- Bullock E, P Fields, W Brandriss. 1972. An evaluation of transfer factor as immunotherapy for patients with lepromatous leprosy. *New Engl J Med* 287, 1053-1059.
- Calzada G. 2000. Uso en lechones de Factor de Transferencia y Parapoxvirus inactivado (*Baypamun*) en la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky. *Tesis Grado Maestra en Ciencias con especialidad en inmunología*, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.
- Capua I, S Marangon. 2000. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: A review. *Avian Pathol* 29, 289-294.
- Delgado O, L Romano, E Belfort, F Pifano, V Scorza, Z Rojas. 1981. Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immuno* 19, 351-359.
- De Wit MC, C Horzinek, L Haagmans, CJ, Schijns. 2004. Host-dependent type 1 cytokine responses driven by inactivated viruses may fail to default in the absence of IL-2 or IFN- $\alpha$ /b. *J Gen Virol* 85, 795-803.
- Estrada-Parra S, O Velasco-Castrejón, F Rébora, L Díaz, J Padierna. 1983. Immunotherapy of advanced pulmonary tuberculosis with specific transference factor. *Salud Pública México* 25, 589-599.
- Fabre RA, M Pérez, D Aguilar, J Rangel, I Estrada-García, R Hernández-Pando, S Estrada-Parra. 2004. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 136, 215-223.
- Flores SG, VJ Gómez, SM Orea, TJ López, E Serrano, A Rodríguez, A Rodríguez, S Estrada-Parra, N Jiménez-Saab. 2005. Factor de transferencia como inmunomodulador específico en el tratamiento de la dermatitis atópica de moderada a severa. *Rev Alerg Mex* 52, 215-220.
- Franco-Molina MA, E Mendoza-Gamboa, L Castillo-León, RS Tamez-Guerra, C Rodríguez-Padilla. 2004. Bovine leukocytary extract protects against LPS-induced murine endotoxic shock. *Int Immunopharmacol* 4, 1577-1586.
- García-Ángeles J, G Flores-Sandoval, M Orea-Solano, E Serrano, S Estrada-Parra. 2003. Apoptosis de linfocitos en dermatitis atópica en el tratamiento con factor de transferencia. *Rev Alerg Mex* 50, 3-7.
- Kaiser P, G Underwood, F Davison. 2003. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J Virol* 77, 762-768.
- Kirkpatrick C. 1993. Structural nature and functions of transfer factor. *Ann NY Acad Sci* 685, 362-367.
- Kirkpatrick CH. 2000. Transfer factor: identification of conserved sequences in transfer factor Molecules. *Mol Med* 6, 332-341.
- Klesius PH, J Giambro. 1984. Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. *Poultry Sci* 63, 1333-1337.
- Kogut MH, K Genovese, B Moyes, H Stanker. 1998. Evaluation of Oral, Subcutaneous, and Nasal Administration of *Salmonella enteritidis*-Immune Lymphokines on the Potentiation of a Protective Heterophilic Inflammatory Response to *Salmonella enteritidis* in Day-old Chickens. *Can J Vet Res* 62, 27-32.
- Lawrence HS. 1949. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *P Soc Exp Biol Med* 71, 516-519.
- Lawrence HS, W Borkowsky. 1983. A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor- an arcane, dialect in the language of cells. *Cell Immunol* 82, 102-116.
- Lillehoj HS, D Choi. 1998. Recombinant chicken interferon- mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Dis* 42, 307-314.
- Lowenthal JW, E O'Neil, M Broadway, D Strom, R Digby, M Andrew, J York. 1998. Coadministration of IFN- $\gamma$  enhances antibody responses in chickens. *J Interf Cytok Res* 18, 617-622.
- Loza RE, F Esquivel, J Mercado, L Gutiérrez, V Banda, A Verdugo. 2003. Expresión del ARNm de la IL-2 en bazos de pollos vacunados contra el virus de la Influenza Aviar. *Tec Pecu Méx* 41, 141-152.
- Mateos RA. 1992. Transfer factor immunotherapy in clinically sick lactating calves. *Vet Mexico* 23, 4-8.
- McCormick AL, S Thomas, W Heath. 2001. Immunization with an interferon- $\gamma$  gp120 fusion protein induces enhanced immune responses to human immunodeficiency virus gp120. *J Infect Dis* 184, 1423-1430.
- Muhammad K, A Muneer. 1997. Isolation and characterization of avian influenza virus from an outbreak in commercial poultry in Pakistan. *Pak Vet J* 17, 6-8.
- Naem K, M Hussain. 1995. An outbreak of avian influenza in poultry in Pakistan. *Vet Rec* 137, 439.
- Ojeda-Ojeda M, C van't Veer, CB Fernández-Ortega, MJ Araña-Rosainz, WA Buurman. 2005. Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Inflamm Res* 54, 74-81.
- Padierna L, S Godínez, J Díaz, E García, A Argaez, O Velasco, J Padierna, S Estrada-Parra. 1985. Factor de transferencia en pacientes con herpes zóster. *Infectología* 11, 293-299.
- Pineda B, S Estrada-Parra, B Pedraza-Medina, A Rodríguez-Ropon, R Pérez, O Arrieta. 2005. Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma. *J Exp Clin Onc Res* 24, 207-215.
- Pizza G, F Chiodo, V Colangeli, F Gritti, E Raise, H Fudenberg, C De Vinci, D Viza. 1996. Preliminary observations using HIV-specific transfer factor in AIDS. *Biotherapy* 9, 41-47.
- Rojas BS. 1987. Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. *Tesis de licenciatura*, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Röhm C, J Süß, V Pohle, G Webster. 1996. Different hemagglutinin cleavage site variants of H7N7 in an influenza outbreak in chickens in Leipzig, Germany. *Virology* 218, 253-257.
- Rothwell L, R Young, R Zoorob, A Whittaker, P Hesketh, A Archer, L Smith, P Kaiser. 2004. Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *J Immunol* 173, 675-682.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809.
- Schijns VE, C Scholtes, I Zuilekom, E Sanders, L Nicolson, J Argyle. 2002. Facilitation of antibody forming responses to viral vaccine antigens in young cats by recombinant baculovirus-expressed feline IFN- $\gamma$ . *Vaccine* 20, 1718-1724.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-044-Z000. La influenza aviar en México. Memoria. México.
- Snapper CM, E Paul. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulates Ig isotype production. *Science* 236, 944-947.
- Stark GR, M Kerr, RG Williams, H Silverman, D Scheiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-64.
- Swayne DE, R Beck, M García, D Stone. 1999. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathol* 28, 245-55.
- Torres MH. 1994. Efecto del factor de transferencia específico en contra de *A. pleuropneumoniae* serotipo 5 y *P. multocida* A en cerdos. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Wilson GB, C Poindexter, D Fort, D Ludden. 1988. De Novo initiation of specific cell-mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducers) obtained from bovine colostrums and milk. *Acta Virol* 32, 6-18.
- Yilma T, S Owens, H Fennie, P Anderson. 1989. Enhancement of primary and secondary immune responses by interferon. *Adv Exp Med Biol* 251, 145-152.