

Expresión del ARNm de la IL-2 en bazos de pollos vacunados contra el virus de la influenza aviar

IL-2 mRNA expression in spleens of chickens inoculated with avian influenza virus vaccine

Elizabeth Loza Rubio^{a,d}, Fernando Esquivel Guadarrama^b, Juan Mercado Solís^b, Lourdes Gutiérrez Xicotencatl^c, Víctor Manuel Banda Ruiz^a, Antonio Verdugo Rodríguez^d

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estandarizar un ensayo de Transcripción reversa en cadena de la polimerasa (RT/PCR) para detectar la presencia de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la Interleucina 2 (IL-2), con la finalidad de determinar su expresión en linfocitos de pollos inmunizados con una vacuna inactivada experimental contra influenza aviar (IA), la vacuna inactivada experimental contra IA adicionada con proteína N recombinante del virus de la rabia (N-Bac) y una vacuna comercial. Para la estandarización, se obtuvieron linfocitos de pollos que fueron cultivados a 1×10^6 y 1×10^7 células/ml en presencia de Concanavalina A (Con-A) a una concentración de 5, 10 y 30 mg/ml, durante 5, 24 y 48 h. Se extrajo el ARN de los linfocitos y se sintetizó el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) utilizando oligo(dT). Para llevar a cabo el PCR se diseñaron cebadores específicos dentro de la secuencia del gen de la IL-2 de pollo. Se determinó que 10 mg de Con-A durante 24 h y una concentración celular de 1×10^7 mostraron los mejores resultados con respecto a los niveles de ARNm para IL-2 entre los linfocitos activados y los controles (linfocitos sin activar). Como gen constitutivo se empleó la β -actina. La cinética de expresión se realizó en linfocitos obtenidos a los días 0, 1, 4 y 10 posvacunación. El grupo control fueron linfocitos de pollos no vacunados. Se estableció que las vacunas contra IA incrementaron la expresión de la IL-2 en pollos, en comparación de los controles. Se concluye que el RT/PCR puede ser empleado para analizar la expresión de la IL-2 de pollo.

PALABRAS CLAVE: IL-2 pollo, RT/PCR, Influenza aviar, Virus de rabia, Proteína N, Proteína recombinante.

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT/PCR) assay to detect IL-2 mRNA in lymphocytes from chickens inoculated with an experimental avian influenza vaccine, an experimental avian influenza vaccine added with rabies virus N recombinant protein, and a commercial influenza vaccine. For standardization, chicken lymphocytes were obtained in different quantities (1×10^6 , 1×10^7 cells/ml), and activated by means of Concanavalin A (Con A) at 5, 10 and 30 mg/ml for 5, 24 and 48 h. RNA was extracted from lymphocytes and cDNA using oligo (dT) was synthesized. Primers to amplify avian IL-2 were designed from consensus sequences obtained from the GeneBank database. It was determined that 10 mg of Con-A added to 1×10^7 cells for 24 h showed the best results to differentiate activated lymphocytes from non-activated cells (control). β -actin was used as constitutive gene. A kinetic expression analysis was performed using lymphocytes obtained at 0, 1, 4 and 10 d post-vaccination. Cells coming from non-vaccinated chickens were used as control. It was established that avian influenza vaccines increased the ratio expression of avian IL-2 when compared to the control group. It can be concluded that RT/PCR may be used to analyze avian IL-2 expression.

KEY WORDS: Avian IL-2, RT/PCR, Avian influenza vaccines, Rabies virus, N protein, Recombinant protein.

Recibido el 9 de octubre de 2002 y aceptado para su publicación el 13 de diciembre de 2002.

a Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, INIFAP. Carretera México-Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto. 05110. eli_rubio33@hotmail.com. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

b Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

c Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, INSP SSA, Cuernavaca, Morelos.

d Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

INTRODUCCIÓN

En las aves han sido caracterizadas a nivel molecular ocho citocinas: el interferón tipo I⁽¹⁾ y II⁽²⁾, el factor de crecimiento mielomonocítico (myelomonocytic growth factor-MGF)⁽³⁾, el factor transformante del crecimiento-b (transforming growth factor-TGF- β)⁽⁴⁾, la IL-6, la interleucina I- β ⁽⁵⁾, el IFN γ y la IL-2^(6,7). Los principales problemas para clonar citocinas en esta especie han sido que salvo excepciones, las citocinas de mamíferos generalmente no tienen efecto en los bioensayos de aves^(8,9). De hecho ninguna interleucina de la rama Th2 (IL-4, IL-5 ó IL-10) ha sido clonada⁽¹⁰⁾. Otro de los problemas, aún en especies diferentes a las aves, es la degradación del ácido ribonucleico (ARN), lo cual puede ocurrir durante la manipulación de las muestras⁽¹¹⁾; a pesar de ello la detección de ARN mensajero (ARNm) es un método alterno para demostrar la inducción de estos mediadores⁽¹²⁾. Existen varias técnicas para medir esta expresión como el Northern blot, el ensayo de protección de Rnasa, la hibridación *in situ* y la transcripción reversa previa a la reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR).

La IL-2 es un poderoso factor de crecimiento para una variedad de células y juega un papel clave en la diferenciación y desarrollo de células T y la activación de células NK, además de ser un potente inmunomodulador. La IL-2 de pollo tiene funciones similares *in vivo* e *in vitro*, e incrementa la proliferación de células T y la citotoxicidad espontánea^(13,14).

Ante la imposibilidad de realizar un ensayo biológico para la identificación de la IL-2, como el uso de células indicadoras murinas CTLL-2 (IL-2 dependent T cell), que presenta barrera interespecie^(15,16), el RT/PCR ha llegado a ser una poderosa herramienta para el estudio de la expresión de genes en tejidos mamíferos y también ha sido exitosamente usada para detectar la expresión de citocinas en diferentes especies animales^(17,18,19).

Se ha mencionado a la proteína N del virus de la rabia como inmunomodulador, pues su presencia aumenta la protección inducida por las vacunas

INTRODUCTION

Eight cytokines at the molecular level have been characterized in poultry: Interferon types I⁽¹⁾ and II⁽²⁾, myelomonocytic growth factor-MGF⁽³⁾, transforming growth factor-TGF- β ⁽⁴⁾, interleukin I- β IL-6⁽⁵⁾, IFN γ and IL-2^(6,7). The main problems when cloning cytokines in poultry is that mammal cytokines in general don't produce any responses in poultry bioassays^(8,9). In fact no Th2 (IL-4, IL-5 or IL-10) interleukin has been cloned⁽¹⁰⁾. Another problem, even in other species, is RNA degradation which can happen when samples are being manipulated⁽¹¹⁾. Because of this, mRNA detection is an alternative method to demonstrate modulator induction⁽¹²⁾. Several techniques to characterize this expression have been developed, such as Northern Blot, RNAase protection assay, *in situ* hybridization, and Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction (RT/PCR).

IL-2 is a powerful growth factor for a wide variety of cells and plays a key role in T-cell differentiation and development and NK cell activator besides being a powerful immunomodulator. Chicken IL-2 develops similar functions *in vivo* and *in vitro* and increases proliferation of T Cells and spontaneous cytotoxicity^(13,14).

In view of the impossibility of performing a bioassay to identify IL-2, such as murine indicator cell CTLL-2 (IL-2 dependent T cell), which presents an insurmountable species barrier^(15,16) Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction (RT/PCR) has become a powerful tool for gene expression characterization in mammalian tissues and also have been used with success to detect cytokine expression in several animal species^(17,18,19).

Rabies virus N recombinant protein has been mentioned as an immunomodulator, because its presence increases protection induced by the antirabies vaccine^(20,21,22). In vaccines containing non-homologous virus, when N protein is added to a human influenza vaccine, antibody development was promoted and immunological memory was induced in mice⁽²³⁾. In veterinary medicine this characteristic has been tested in avian influenza vaccine (AI) in chickens⁽²⁴⁾ and in bovine cattle

antirrábicas^(20,21,22). En vacunas que contienen virus no homólogos, la proteína N al ser adicionada a una vacuna de influenza humana indujo la promoción de anticuerpos y el establecimiento de memoria inmunológica en ratones⁽²³⁾. En el campo veterinario esta característica se ha probado en vacunas de influenza aviar (IA), en pollos⁽²⁴⁾, y en parainfluenza 3 bovina (PI-3)⁽²⁵⁾. Esta propiedad se ha relacionado a que la proteína N es un superantígeno (SAg) que posee la particularidad con respecto a otros de ser un mitógeno débil *in vitro*^(23,26).

El objetivo de este estudio fue el de estandarizar un ensayo de RT/PCR para detectar la presencia de ARNm de la Interleucina 2 (IL-2), para posteriormente analizar la cinética de expresión obtenida a partir de linfocitos de pollos inmunizados con una vacuna inactivada experimental contra IA⁽²⁴⁾, la vacuna experimental contra IA adicionada con proteína N recombinante (N-Bac) del virus de la rabia y una vacuna comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron huevos embrionados, libres de patógenos específicos (SPF) en la empresa Aves libres de patógenos específicos (ALPES), Tehuacán, Puebla, México, que se incubaron hasta el nacimiento. Las aves fueron mantenidas con alimento comercial y agua *ad libitum*, se alojaron en jaulas convencionales con calefacción local, en unidades de aislamiento que contaban con sistema de filtración con presión negativa, filtros absolutos y una cortina de luz ultravioleta a la salida del aire.

Para estandarizar el ensayo de RT/PCR, se obtuvieron bazos de pollos SPF de seis semanas de edad en condiciones asépticas, se pasaron a través de una criba de acero inoxidable, empleando para ello una solución de Hank (In Vitro, México D.F.). Posterior a ello, las células esplénicas se separaron usando Nycoprep 1.077 (Nycomed Pharmaas, Norway). Las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en medio RPMI 1640 (In Vitro, México D.F.), adicionado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (estreptomomicina 100 µg y

parainfluenza 3 (PI-3)⁽²⁵⁾. This property has been related to the fact that N protein is a superantigen (Sag) having *in vitro* weak mitogen properties when compared to others^(23,26).

The aim of this study was to standardize a Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT/PCR) assay to detect IL-2 mRNA, and subsequently analyze expression kinetics in lymphocytes of chickens immunized with an experimental inactivated AI vaccine⁽²⁴⁾, the same vaccine added with rabies virus N recombinant protein (N-Bac) and an AI commercial vaccine.

MATERIALS AND METHODS

Fertile eggs free of specific pathogens were obtained from the ALPES¹ company and incubated. Birds were fed with commercial feed and provided with water *ad libitum*, kept in conventional cages with room heating, in special isolation units provided with negative pressure filtration, absolute filters and an ultraviolet curtain at the air exit.

To standardize the assay, spleens of six week old SPF chickens obtained in aseptic conditions, sieved through stainless steel with a Hank solution (In Vitro, Mexico DF) were employed. Afterwards, splenic cells were separated by means of Nycoprep 1.077 (Nycomed Pharmas, Norway) and lixiviated twice and resuspended in a RPMI 1640 media (In Vitro, Mexico DF), added with 10 % bovine foetal serum and antibiotics (Streptomycin 100 µg and Penicillin 100 IU/ml). For assay standardization 1 x 10⁶ and 1 x 10⁷ cell/ml concentrations of RPMI 1640 media and activated by means Concanavalin-A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at 5, 10 and 30 µg/ml for 5, 24 and 48 h respectively were used. Non-stimulated chicken cells were used for control. Spleenocytes were collected through centrifugation and frozen at -70 °C until needed.

To analyze IL-2 expression in immunized animals with an experimental inactivated AI vaccine⁽²⁴⁾, the same vaccine added with 20 µg of rabies virus N recombinant protein expressed through baculovirus expression (N-Bac) and an AI commercial vaccine (inactivated and emulsified),

penicilina 100 UI/ml). Para la estandarización de la prueba se usaron concentraciones de 1×10^6 y 1×10^7 células/ml de medio RPMI 1640 que fueron activadas con 5, 10 y 30 μg de Concanavalina-A (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA), durante 5, 24 y 48 h respectivamente. Como testigo se usaron células de pollos sin estimular. Los esplenocitos se colectaron por centrifugación y se congelaron a -70°C hasta su uso.

Para analizar la expresión de la IL-2 manifestada por animales inmunizados con una vacuna experimental inactivada de IA⁽²⁴⁾, la vacuna experimental adicionada con 20 μg de proteína N del virus de la rabia expresada por un sistema de expresión en baculovirus (N-Bac) y una vacuna comercial (inactivada y emulsionada) contra IA. De cada una de las vacunas se administraron 0.5 ml, vía subcutánea en el cuello a tres pollos de ocho días de edad, sus bazos se extrajeron a los días 0, 1, 4 y 10 posvacunación, y se procesaron de la manera descrita anteriormente.

El ARN total se extrajo a partir de las células congeladas utilizando el método del TRIzol (Gibco BRL, NY, USA), según el protocolo del laboratorio productor. El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (Genequant II, Pharmacia, NJ, USA) y se almacenó a -70°C .

El ADN complementario (ADNc) fue obtenido agregando 2 μg de ARN a un volumen total de 20 μl de reacción que contenía 0.5 mM de oligo (dT) (Gibco, BRL, NY, USA), 3 mM de MgCl_2 , 10 mM de cada dNTP, 40 U de RNAsin (Promega, WI, USA) y 200 unidades de M-MLV transcriptasa reversa (Gibco, BRL, NY, USA). La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 h, calentada a 95°C durante 10 min, y conservada a -20°C hasta que se realizó el PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo agregando 2 μl de ADNc a una mezcla que contenía 10 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.001 % de gelatina, 0.2 mM de una mezcla de dNTP. Los iniciadores se agregaron a razón de 0.15 μM de cada uno. Como gen constitutivo se utilizó β -actina de pollo.

0.5 ml of each vaccine was applied subcutaneously in the neck to three 8 d old chickens and their spleens extracted 0, 1, 4 and 10 d post-vaccination and processed as described.

All of the RNA was extracted from the frozen cells by means of the TRIzol method (Gibco, BRL, NY, USA) in accordance with the manufacturing laboratory's protocol. RNA was quantified with a spectrophotometer (Genequant II, Pharmacia, NJ, USA) and stored at -70°C .

Complementary DNA (cDNA) was obtained by adding 2 μg of RNA to a 20 μl solution containing 0.5 mM oligo (dT) (Gibco, BRL, NY, USA), 3mM MgCl_2 , 10 mM of each dNTP, RNAsin 40 U (Promega, WI, USA) and M-MLV reverse transcriptase (Gibco, BRL, NY, USA) 200 units. This blend was incubated at 37°C for 1 h, heated to 95°C for 10 min and stored at -20°C until polymerase chain reaction (PCR).

PCR was performed adding 2 μl cDNA to a solution containing 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.001 % gelatin, 0.2 mM of a dTTP mixture. Primers were added at a 0.15 μM rate each. Chicken β -actin was used as constitutive gene.

All tests were performed with the following program: 92°C 75 sec one cycle; 92°C 45 sec, 50°C 60 sec, 72°C 60 sec 30 cycles with 72°C 7 min final extension. PCR products were visualized in a 6 % polyacrylamide gel, and stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Primer sequence can be seen in Table 1. GeneBank access number in is AJ224516. Expected product length for IL-2 were of a 331 base pairs (bp) for the first primer pair and 469 bp for the second, while the size for β -actin was 569 bp.

To quantify the level of each one of the PCR products, gels were photographed with an Edas 120 camera (Kodak, NY, USA). Band intensity was analyzed by means of the National Institute of Health (NIH) program. mRNA relative expression levels in each sample were compared through band

Todas las reacciones se llevaron a cabo usando el siguiente programa: 92 °C 75 seg un ciclo; 92 °C 45 seg, 50 °C 60 seg, 72 °C 60 seg 30 ciclos, con una extensión final a 72 °C 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6 %, los cuales se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Las secuencias de los iniciadores empleados pueden verse en el Cuadro 1. El número de acceso en el banco de genes (GeneBank) es el AJ224516. Los productos esperados para la IL-2 eran de 331 pares de bases (pb) para el primer par de iniciadores y 469 pb para el segundo, mientras que para la β-actina el tamaño del producto era de 569 pb.

Para cuantificar el nivel de cada uno de los productos de PCR, los geles se fotografiaron con una cámara Edas 120 (Kodak, NY, USA). La intensidad de las bandas fueron analizadas mediante el programa del National Institute of Health (NIH). Para comparar los niveles de expresión relativa del ARNm de cada una de las muestras, los valores se presentan como el radio de la intensidad de la banda del producto de PCR de la citocina sobre el producto de PCR del gen constitutivo (β-actina).

RESULTADOS

En el transcurso de este estudio se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la detección de ARNm, tanto de la β-actina empleada como gen constitutivo, así como la de la IL-2. Después de haber ensayado en repetidas ocasiones diferentes condiciones y temperaturas para la estandarización del RT/PCR para ambas moléculas, las condiciones y el programa que produjo los mejores resultados aparecen en la sección de Materiales y métodos.

En la Figura 1 se observa la detección de la expresión del ARNm de la β-actina de pollo obtenida de linfocitos activados con 10 µg/ml de Concanavalina durante 24 h; se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 pb y de bajo peso molecular (LML) (Gibco BRL, NY, USA). El producto de amplificación fue corrido en un gel de acrilamida al 6 % y fue teñido con bromuro de etidio.

intensity radius of each cytokine PCR on the constitutive gene (β-actin) PCR product.

RESULTS

In the course of this study, conditions to detect mRNA were standardized, both for β-actin, used as constitutive gene, and IL-2. After having tested repeatedly diverse conditions and temperatures for RT/PCR standardization for both molecules, conditions and the program which produced the best results have been described in Materials and methods.

In Figure 1, mRNA expression detection of chicken β-actin obtained from lymphocytes activated with 10 µg/ml Concanavalin for 24 h is shown. Markers of 100 bp and low molecular weight (LML) (Gibco, BRL, NY, USA) were used. Amplification products were run in a 6 % polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide.

To standardize the program's optimum conditions three different line-up temperatures were tested, 45, 50 and 55 °C, 50 °C being the one that produced better responses respect of mRNA levels for IL-2 for activated and non-activated lymphocytes (Figure 2), while 1×10^7 cells/ml was the cell concentration which best showed this difference.

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores utilizados para establecer el ensayo de RT/PCR para detectar los genes de la IL-2 y la β-actina de pollo

Table 1. Primer sequence used to establish a RT/PCR assay to detect IL-2 and chicken β-actin genes

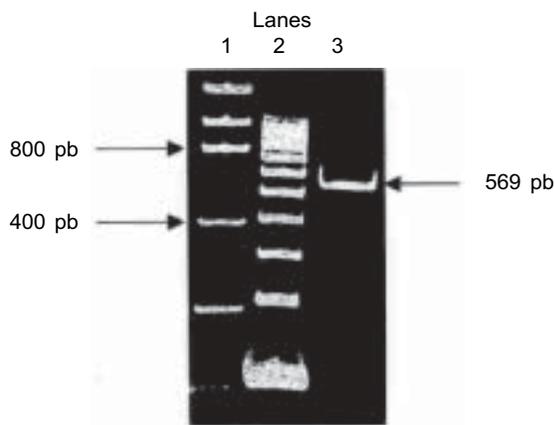
Cytokines	5'-3' sequence	Product size (bp)
IL-2 (+)	atg atg tgc aaa gta ctg atc	331
IL-2 (-)	gat tta gac ccg taa gac tc c	
IL-2 (+)	agt gtt acc tgg gag aag t	469
IL-2 (-)	tta ccg aca aag tga gaa tc	
β-actina (+)	ctg gtc gta cca ctg gta ttg	569
β-actina (-)	cag gtg gcg caa tga tct tg	

RT/PCR= Reverse transcriptase/polymerase chain reaction

bp= base pairs.

Figura 1. Detección de la expresión del ARNm de la β -actina de pollo obtenida de linfocitos activados con 10 mg/ml de Concanavalina-A, durante 24 h

Figure 1. Detection of mRNA expression from chicken β -actin obtained from lymphocytes activated with 10 μ g of Concanaline-A for 24 h



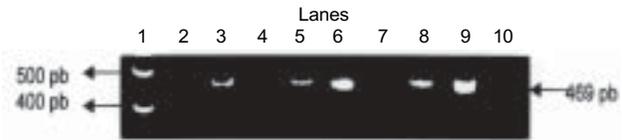
Lane 1: low molecular weight markers; lane 2: 100 bp markers; lane 3: β -actin.

Para estandarizar las condiciones óptimas del programa se probaron tres diferentes temperaturas de alineación: 45, 50 y 55 °C, de ellas, la temperatura que se adoptó fue la de 50 °C, ya que fue la que mejores resultados manifestó con respecto a los niveles de ARNm para IL-2 entre los linfocitos sin activar y los activados con 10 μ g/ml de Con-A durante 24 h (Figura 2). De igual manera la concentración celular que mostró mejor esta diferencia fue la de 1×10^7 .

Una vez establecidas las condiciones idóneas para el RT/PCR, se procedió a extraer ARN de linfocitos congelados a -70 °C, que provenían de tres animales de grupos que incluyeron la vacuna experimental, la vacuna experimental contra IA adicionada con 20 μ g de N-Bac, la vacuna comercial y el grupo control inoculado con líquido alantoideo sin infectar (LASI). En la Figura 3 se observan los niveles de expresión relativa del ARNm de cada una de las muestras tomadas a los días 0, 1, 4 y 10 postvacunación v de los pollos inmunizados con los diferentes tratamientos, así como de células de animales sin vacunar y sin activar *in vitro* (control

Figura 2. Expresión del ARNm de un fragmento del gen de la IL-2 de pollo

Figure 2. mRNA expression of a chicken IL-2 gene fragment



Lane 1: low molecular weight markers; lanes 2, 5 y 8: PCR products obtained from lymphocytes not activated with Con-A; lanes 3, 6 y 9: PCR products obtained from chicken lymphocytes activated with Con-A 10; lanes 4, 7 y 10: water.

Once the most suitable conditions for RT/PCR were set, RNA from the frozen lymphocytes was extracted, and which came from three animals belonging to groups who were inoculated with the experimental vaccine, the experimental vaccine added with 20 μ g N-Bac, a commercial vaccine and control which was inoculated with uninfected alantoid liquid (UAL). In Figure 3 mRNA relative expression levels of each sample taken at 0, 1, 4 and 10 days after vaccination can be seen as well of chickens immunized with different treatments and *in vitro* non-activated cells from non-vaccinated animals (negative control) and from lymphocytes activated with 10 μ g Con-A (positive control). mRNA relative expression levels of each sample were expressed as an intensity radius of the IL-2 RT/PCR product band on the β -actin RT/PCR product. As can be seen, both AI vaccines, experimental and commercial, increased IL-2 expression level when compared to control, reaching its highest level on d 4 post-vaccination, with similar values on d 10 post-vaccination. IL-2 expression for AI vaccine added with N-Bac was lower in d 1 when compared to the other treatments' performance. On d 4 and 10 post-vaccination expression radius reached similar levels, however it always was smaller when measured.

DISCUSSION

Standardization of the RT/PCR assay was imperative in the present study, to be able to analyze chicken

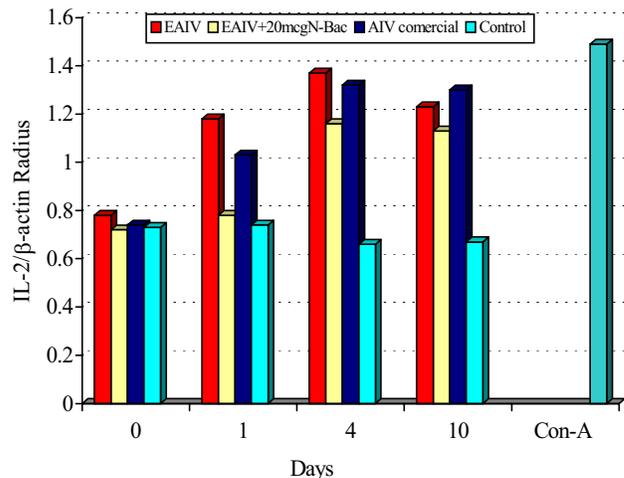
negativo), y de linfocitos activados con 10 µg de Con-A (control positivo). Los niveles de expresión relativa del ARNm de cada una de las muestras se representaron como el radio de la intensidad de la banda del producto del RT/PCR de la IL-2 sobre el producto del RT/PCR de la β-actina. Como puede observarse, las vacunas contra IA tanto experimental como comercial incrementaron los niveles de expresión de la IL-2 en comparación con el testigo, llegando a su máximo al día 4 postvacunación, manteniéndose similares al día 10 postvacunación. La expresión de la IL-2 de la vacuna contra IA adicionada con la N-Bac fue menor el día 1 en comparación con el comportamiento de los otros tratamientos; al día 4 y 10 el radio de expresión se incrementó a niveles similares, sin embargo en las mediciones realizadas siempre fue menor.

DISCUSIÓN

En la presente investigación fue necesario estandarizar el ensayo de RT/PCR, con el propósito de analizar la cinética de expresión de la IL-2 de pollo inducida por tres diferentes productos, que incluían una vacuna experimental de IA adicionada con una proteína N del virus de la rabia, así como con la vacuna experimental sola y una vacuna comercial contra esta enfermedad, pues siendo la proteína N un SAg se pensó que podría promover la expresión en altas cantidades de esta molécula, pues al menos los SAg's bacterianos producen una elevada secreción de IL-2 en humanos y en ratones^(27,28). No obstante, Astoul *et al.*⁽²³⁾ mencionan que el SAg de rabia no induce cantidades elevadas de IL-2, por ser un mitógeno débil, además de probar que posee una acción adyuvante en ratones cuando fue adicionado a una vacuna contra la influenza humana; en el campo veterinario se ha comprobado que esta acción inmunestimulante se presenta en hámsters vacunados contra el virus de parainfluenza 3 bovina promoviendo una temprana respuesta humoral⁽²⁵⁾. En pollos, aunque los niveles de anticuerpos no fueron elevados (media geométrica de cinco unidades inhibitoras de la hemaglutinación antes del desafío), la adición de proteína N a una vacuna experimental de IA incrementó más de un 20 % la protección, en

Figura 3. Cinética de expresión del ARNm derivada de linfocitos de pollos vacunados con los tratamientos citados*

Figure 3. Expression kinetics of mRNA derived from lymphocytes of chickens vaccinated with diverse treatments*



* Lymphocytes were isolated on days 0, 1, 4 y 10 after vaccination from three different animals. Positive controls were lymphocytes activated with 10 mg/ml of Con-A for 24 h.

EAIV = Experimental avian influenza vaccine.

AIV = Avian influenza vaccine.

IL-2 kinetic expression induced by three different products, an experimental AI vaccine, the same vaccine added with rabies virus N protein and a commercial AI vaccine. Being the N protein a SAg, a probability existed of it being able to promote a high expression of this molecule, because bacterial SAg's encourage a high IL-2 secretion in humans and rats^(27,28). However, Astoul *et al.*⁽²³⁾ mention that the rabies SAg doesn't induce high IL-2 amounts, owing to the fact of being a weak mitogen and also because it presents a support function in mice when added to a human influenza vaccine. In veterinary medicine, this immunostimulant function has been found in hamsters inoculated against human parainfluenza 3 virus promoting an early humoral response⁽²⁵⁾. In chickens, even though antibody levels weren't high (the geometric average² of five hæmoagglutination inhibitor units before challenge), when N protein was added to an AI experimental

comparación con la vacuna a la que no se le agregó la proteína N⁽²⁴⁾.

En el desarrollo de este estudio pudo observarse que el número de células es crítico para poder amplificar la expresión, ya que al tratar de utilizar tratamientos donde sólo se habían obtenido un millón de células por vial, la amplificación no fue eficiente, ya que en ciertos ensayos ésta se lograba y en otros no. Varias publicaciones emplean diferente número de células para sus ensayos; Kramnik *et al.*⁽²⁹⁾ utilizan dos millones de linfocitos de rata por ml; Thiagarajan *et al.*⁽³⁰⁾ mencionan que compararon tres diferentes densidades de células y que para su propósito de producir IL-2 *in vitro* detectada en sobrenadantes mediante radioactividad, un millón de células produce índices de estimulación más altas que al usar 5 y 10 millones de células por ml.; Murphy *et al.*⁽³¹⁾ usan 1 x 10⁶ esplenocitos para detectar IL-10 en ratones inoculados con *Schistosoma mansoni*, pero refieren que no siempre es posible cuantificar la cantidad de ARN obtenido de un pequeño número de células, lo cual concuerda con lo observado en este estudio, ya que para poder estandarizar la RT/PCR se tuvieron resultados más consistentes cuando se emplearon 1 x 10⁷ células, que cuando se usaron 1 x 10⁶ (datos no mostrados). Otros investigadores⁽³²⁾ concuerdan con este estudio, al emplear diez millones de células por ml para usar su ARNm en un estudio de Northern blot para caracterizar molecularmente IL-2 de pollo.

En este estudio fue necesario probar dos diferentes pares de oligonucleótidos para lograr detectar la expresión del ARNm de la IL-2; esto se debió a que el producto esperado del primer par debía producir un producto de 331 pb, y el producto aparecía en 368 pb. Al analizar la secuencia de estos iniciadores se observó que las cuatro últimas bases eran complementarias, por lo que se atribuyó a este hecho la discordancia entre el producto obtenido y el esperado, por este motivo durante el desarrollo del proyecto se decidió ensayar con otros iniciadores, con los que se logró detectar la expresión de la IL-2 de pollo. Cabe mencionar que fue necesario estandarizar todas las condiciones para lograr desarrollar esta técnica en pollos, pues

vaccine, protection increased more than 20 %, compared to a vaccine to which no N protein was added⁽²⁴⁾.

Throughout this study it was seen that the amount of cells is critical for expression amplification, because when trying to use treatments in which only 1 x 10⁶ cells per phial had been obtained, amplification was not efficient, because in some instances it was positive and not in others. Several authors use different amounts of cells for their tests; Kramnik *et al.*⁽²⁹⁾ use 2 x 10⁶ mice lymphocytes/ml; Thiaragan *et al.*⁽³⁰⁾ mention that when three different cell densities were compared to produce *in vitro* IL-2 detected in overflows through radioactivity, 1 x 10⁶ cells/ml generated higher stimulation indexes than 5 x 10⁶ or 1 x 10⁷ cells/ml; Murphy *et al.*⁽³¹⁾ used 1 x 10⁶ spleenocytes to detect IL-10 in mice inoculated with *Schistosoma mansoni*, but mention that it was not always possible to quantify the RNA amount obtained from a small amount of cells, which is in accordance with what was observed in the present study, for to be able to characterize RT/PCR, more consistent results were obtained when 1 x 10⁷ cells/ml were used (data not shown). Other authors⁽³²⁾ concur with the present study, using 1 x 10⁷ cells/ml to use their nRNA in a Northern blot study to characterize molecularly chicken IL-2.

In the present study it was necessary to probe two different oligonucleotide pairs to be able to detect IL-2 mRNA expression. This was due to the fact that the expected product of the first pair should be of 331 bp but the one obtained was of 368 bp. When these primers' sequence was analyzed, it was seen that the last four bases were complementary, and therefore the difference between the products obtained and expected was attributed to this fact. Owing to this, other primers were tried, with which it was also possible to detect chicken IL-2 expression. It should be mentioned that it was necessary to standardize every condition to be able to develop this technique for chickens, because no publications were found which described a viable procedure. Because several publications mentioned lymphocyte activation in other species with diverse Con-A concentrations^(30,33,34); three

no se encontró ninguna publicación que hasta ese momento la hubiese mencionado para el propósito aquí planteado.

Dado que existían publicaciones donde la activación de linfocitos de otras especies se realizaba a diferentes concentraciones de Con-A^(30,33,34); en este estudio se probaron tres diferentes concentraciones (5, 10 y 30 μg) obteniendo mejores resultados al usar 10 μg de Con-A, lo cual coincide con otros investigadores^(18,35,36).

Otro parámetro que se estandarizó fue el tiempo de activación que producía mejores resultados en cuanto a definición de banda; con respecto a ello se evaluaron tres diferentes tiempos: 5, 24 y 48 h. Al igual que en el experimento de Sundick y Gill⁽³³⁾, el mensaje de la IL-2 de pollo fue detectado desde las 5 h, sin embargo éste se manifestó en forma débil. Los mejores resultados se obtuvieron en los linfocitos activados durante 24 h, lo cual coincide con otros trabajos^(30,32,35), aunque Gehad *et al.*⁽³⁷⁾ emplearon 48 h para la activación de las células. Por otro lado, el ARN obtenido de cada muestra pudo ser evaluado para medir la expresión de la IL-2 utilizando un gen constitutivo, como la β -actina, lo cual revela pérdidas o degradación en el ARN, así como fallas durante la transcripción reversa o el PCR.

En cuanto a los resultados obtenidos en la cinética de expresión, es de llamar la atención que la expresión de la IL-2 en el grupo que contiene a la proteína N (N-Bac) fue menor a la producida por la vacuna experimental y por la comercial, e incluso al día 1 la expresión fue similar al grupo testigo (animales no vacunados), aunque a los días 4 y 10 presentó un repunte en su expresión. El estandarizar la técnica de RT/PCR se realizó como una alternativa para poder inferir si el SAg de rabia es un mitógeno débil, en comparación con SAg bacterianos como el TSS-1, ya que Martínez-Arends *et al.*⁽³⁸⁾ analizan la respuesta de la NC sobre la producción de citocinas de linfocitos obtenidos de amígdalas humanas, y concluyen que la producción de IL-2 no es significativamente diferente con o sin NC, empleando un ensayo inmunoenzimático (ELISA); en cambio cuando se emplea TSS-1 la

different Con A intensities were tested in the present study (5, 10 and 30 μg) and the best results were obtained with 10 μg , which is in accordance with what was found by other authors^(18,35,36).

Another parameter which was standardized was activation time, to determine which was the one which developed the best results relative to band definition. Three different times were evaluated: 5, 24 and 48 h. The same as in Sundick and Gill's test⁽³³⁾, chicken IL-2 message was detected, albeit weakly, as of 5 h. The best results were obtained with activated lymphocytes for 24 h, data which is in accordance with other authors^(30,32,35), although Gehad *et al.*⁽³⁷⁾, needed 48 h for cell activation. On the other hand, RNA obtained from each sample was evaluated by means of a constitutive gene, as β -actin, to determine IL-2 expression, which reveals RNA loss or degradation, as well as failures in the course of reverse transcription or PCR.

Relative to results obtained in expression kinetics it should be noted that IL-2 expression within the group which includes N protein (N-Bac) was lower than that of both the experimental and commercial vaccines, and on d 1 expression was similar to that of the control group (non vaccinated animals), although on d 4 and 10 an expression upturn was recorded.

Standardization of the RT/PCR technique was performed as an alternative to be able to infer if rabies SAg is a weak mitogen when compared to bacterial SAg as TSS-1, because according to Martínez-Arends *et al.*⁽³⁸⁾, when studying responses to NC on cytokine production derived from human tonsil lymphocytes, IL-2 production isn't significantly different with or without NC, when using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), but when TSS-1 is used secretion of this molecule increases significantly. NC mitogenic activity could be related to the fact that N protein is a poor IL-2 inducer, opposite to TSS-1's effect. These authors affirm that no differences were found when using NC or N recombinant protein^(23,38). In this regard, there is some controversy, because other studies mention IL-2's role as an immunomodulator in vaccines for *Eimeria spp.* to

secreción de esta molécula se dispara significativamente, por lo que se publica que la actividad mitogénica de la NC puede relacionarse con el hecho de que la proteína N es un pobre inductor de IL-2, a la inversa de lo que ocurre con el TSS-1, que está asociado al hecho de que es un fuerte inductor de IL-2. Este mismo grupo de investigadores asevera que no hay diferencias encontradas entre usar NC o proteína N recombinante^(23,38). A este respecto existiría un poco de controversia, ya que existen publicaciones sobre el papel de la IL-2 como inmunomodulador en vacunas contra *Eimeria spp* para mejorar el efecto de las vacunas empleadas en esta especie⁽³⁹⁾. Sin embargo, también se menciona que el virus de Marek produce una baja expresión de IL-2⁽⁴⁰⁾ y que incluso algunas cepas de influenza humana la incrementan o la disminuyen⁽⁴¹⁾.

Aunque quizá el comportamiento seguido por la IL-2, la cual a los días 4 y 10 presentó un repunte en su expresión casi hasta alcanzar el nivel detectado en las otras dos vacunas, pudiera estar relacionada con su capacidad para inducir anticuerpos, ya que se notifica que en animales vacunados con estos tratamientos, la respuesta humoral es detectada al día 14 postvacunación⁽²⁵⁾, lo cual está bien documentado, ya que la IL-2 puede actuar como un factor de crecimiento, y por lo tanto como un estímulo para la producción de anticuerpos⁽²⁸⁾. Además también observaron que la vacuna de IA experimental al ser adicionada con 20 µg de proteína N incrementó la protección ante una cepa virulenta contra IA más de un 20 %⁽²⁴⁾, hecho que bien podría estar relacionado con la participación de alguna otra molécula del sistema inmune⁽⁴²⁾.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se desarrolló un RT/PCR para detectar la expresión de la β-actina como gen constitutivo y para la IL-2 de pollo (molécula importante para el sistema inmune), usando unos iniciadores diseñados específicamente para este estudio. Además se determinó que la expresión de la IL-2 en pollos vacunados contra IA adicionada con 20 µg de N-Bac es menor a la que se presenta con la vacuna de IA experimental y la comercial, lo cual es una

increase their effect on this specie⁽³⁹⁾. However, Marek's virus is also mentioned as producing an IL-2 low expression⁽⁴⁰⁾ and that some strains of human influenza virus as well can increase or diminish this expression⁽⁴¹⁾. Although IL-2 performance, which showed an expression upturn on d 4 and 10 almost to levels detected in the other vaccines, could be related to its capacity to induce antibodies, because in animals vaccinated with these treatments a humoral response was detected 14 d after inoculation⁽²⁵⁾. This fact is well acknowledged, because IL-2 can behave as a growth factor, and therefore as an antibody production stimulant⁽²⁸⁾. In accordance with these authors, the experimental AI vaccine when added with 20 µg of N protein increased protection against an AI virulent strain more than 20 %⁽²⁴⁾, which could be related to another molecule's action on the immune system⁽⁴²⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

A Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT/PCR) assay was developed to detect β-actin expression as a constitutive gene and chicken IL-2 (a molecule of importance for the immune system), using two primers especially designed for this study. Expression of IL-2 in chickens vaccinated against AI with an experimental vaccine added with 20 µg of N-Bac is lower than in animals vaccinated with the commercial or the experimental AI vaccine. This confirms that rabies virus N protein is a weak mitogen which in turn could generate a different response, because protection conferred by the vaccine to which this molecule was added was greater than the one bestowed by the experimental AI vaccine. It should be of interest to standardize the RT/PCR assay for other interleukins which are already sequenced, to be able to have a broader perspective of the effect of rabies SAg on birds' immune system, or to shed light upon protection mechanisms conferred by other vaccines in these species.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Pete Kaiser of the National Institute of Animal Health (Compton, UK) for his advice and for

evidencia de que la proteína N del virus de la rabia es un mitógeno débil que tal vez genera una respuesta diferente, pues la protección conferida por la vacuna que la contuvo aumentó en comparación con la vacuna experimental. Sería de interés estandarizar la prueba de RT/PCR para otras de las interleucinas que ya están secuenciadas, para vislumbrar una perspectiva más amplia sobre el efecto que el SAg de rabia ejerce en el sistema inmune de las aves, o bien esclarecer mecanismos de protección conferidos por otras vacunas en esta especie.

β - actin primer design. To Miguel Ángel Gómez-Lim of CINVESTAV (Irapuato, Mexico) for IL-2 primer design. To Humberto Valdovinos, Daniel de la Rosa and Evelia Flores for their advice. To Bernardo Lozano and Alejandro Suárez (AVIMEX) for their contribution of immunogen. To Lillian A. Oriciari for revision of the abstract. E. Loza-Rubio was awarded a CONACYT scholarship to obtain her PhD. The present study was funded through CONACYT projects K0021 and G34635B and PAEP-UNAM project 107303.

End of english version

AGRADECIMIENTOS

A Pete Kaiser del National Institute of Animal Health (Compton, Inglaterra) por sus sugerencias y diseño de iniciadores para la β -actina. A Miguel Ángel Gómez-Lim del CINVESTAV-Irapuato por el diseño de los iniciadores para la IL-2. A Humberto Valdovinos, Daniel de la Rosa y Evelia Flores por su asistencia técnica. A Bernardo Lozano y Alejandro Suárez (AVIMEX) por la donación de los inmunógenos. A Lillian A. Oriciari por la revisión del resumen en inglés. E. L. R recibió beca CONACYT para realizar estudios de doctorado. A los proyectos CONACYT (K0021 y G34635B) y PAEP-UNAM (107303) por el financiamiento total y parcial, respectivamente.

LITERATURA CITADA

1. Seckellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis. *J Interferon Res* 1994;14:71-79.
2. Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene. *J Interf Cyt Res* 1995;15:939-945.
3. Sterneck E, Blattner C, Graf T, Leutz A. Structure of the chicken myelomonocytic growth factor gene and specific activation of its promoter in avian myelomonocytic cells by protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992;12:1728-1735.
4. Jakowlew SB, Cubert J, Danielpour D, Sporn MB, Roberts AB. Differential regulation of the expression of transforming growth factor- β mRNAs by growth factors and retinoic acid in chicken embryo chondrocytes, myocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1992;150:377-385.
5. Weining KC, Sick S, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homologue of mammalian interleukin-1 β : cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* 1998;258:994.
6. Kaiser P, Wain HM, Rothwell L. Structure of the chicken interferon- γ gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene* 1998;207:25-32.
7. Kaiser P, Mariani P. Promotor sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T cell proliferative activity is IL2 and not IL15. *Immunogenetics* 1992;49:26-35.
8. Kaiser P. Avian cytokines. In: Davidson TF, Morris TR, Payne LN editors. *Poultry Immunology*. Oxford, UK: Abingdon; 1996:83-114.
9. Schat KA, Kaiser P. Avian cytokines. In: Schijns VEJC, Horzinek MC editors. *Cytokines in veterinary medicine*. New York, USA: CAB International; 1997:289-300.
10. Rothwell L, Hamblin A, Kaiser P. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;83:149-160.
11. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3'-untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986;46:659.
12. Cherwinski HM, Schumacher JH, Brown KD, Mosmann T. Two types of mouse helper T cell clone III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990;166:1229-1244.
13. Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on gd T cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gd T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;73:309-321.
14. Miyamoto T, Lillehoj HS, Sohn EJ, Min W. Production and characterization of monoclonal antibodies detecting chicken interleukin-2 and the development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;80:245-257.
15. Lillehoj HS. Lymphocytes involved in cell-mediated immune responses and methods to assess cell-mediated immunity. *Poult Sci* 1991;70:1154-1164.
16. Gómez VGG. Identificación de linfocinas en sobrenadantes de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina A [tesis maestría]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1995.

17. Dozois MC, Oswald E, Gautier N, Serthelon JP, Fairbrother JM, Oswald IP. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;58:287-300.
18. Leutenegger CM, Mislin CN, Sigrist B, Ehrengreuber MU, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Quantitative real time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:291-305.
19. Waldvogel AS, Hediger-Weithaler BM, Eicher R, Zakher A, Zarlenga DS, Gasbarre LC, Heussler VT. Interferon-g and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;7:201-212.
20. Lodmell DL, Sumner JW, Esposito JJ, Bellini WJ, Ewalt LC. Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *J Virol* 1991;65:3400-3405.
21. Lodmell DL, Esposito JJ, Ewalt LC. Rabies virus antinucleoprotein antibody protects against rabies virus challenge in vivo and inhibits rabies virus replication in vitro. *J Virol* 1993;65:6080-6086.
22. Montaña HJA, Lafage M, Lafon M. Measurement of rabies virus N protein in rabies vaccines. *Res Virol* 1995;146:217-224.
23. Astoul E, Lafage M, Lafon M. Rabies superantigen as an Vb T-dependent adjuvant. *J Exp Med* 1996;183:1623-1631.
24. Loza-Rubio E, Molina GJ, Montaña HJA, Verdugo RA. Effect of rabies N protein as adjuvant in an inactivated avian influenza vaccine. *J Can Vet Res* 2002 [enviado].
25. Loza-Rubio E, De Paz VO, Alvarado IA, Guzmán RC, Banda RVM, Salmerón SF. Obtención de una proteína recombinante del virus de la rabia empleada como inmunomodulador, en una vacuna experimental de parainfluenza-3 bovina [resumen]. XXXVII Reunión nacional de investigación pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2001:56.
26. Lafon M, Scott-Algara D, Marche PN, Cazenave PA, Jouvin Marche. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994;180:1207-1214.
27. Maillard I, Luthi F, Acha-Orbea H, Diggelman H. Role of the immune response induced by superantigens in the pathogenesis of microbial infections. *Parasitol* 1997;115:S67-S78.
28. Abbas AK, Lichtan AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 3rd ed. Pennsylvania, USA: WB Saunders Company; 1997.
29. Kramnik I, Skamene E, Radzioch D. Assesment of lymphokine profiles in activated lymphocytes by semiquantitative PCR. *J Immunol Methods* 1993;162:143-153.
30. Thiagarajan D, Ram GC, Bansal MP. Optimum conditions for in vitro chicken IL-2 production and its in vivo role in Newcastle disease vaccinated chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;67:79-91.
31. Murphy E, Hieny S, Sher A, O'Garra A. detection of in vivo expression of interleukin-10 using a semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. *J Immunol Meth* 1993;162:211-223.
32. Lillehoj HS, Min W, Choi KD, Babu SU, Burnside J, Miyamoto T, Rosenthal BM, Lillehoj EP. Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;82:229-244.
33. Sundick RS, Gill-Dixon. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immunol* 1997;59:720-725.
34. Rottman JB, Tompkins WAF, Tompkins MB. A reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Vet Pathol* 1996;33:242-248.
35. Giguère S, Prescott JF. Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription competitive polymerase reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;7:1-15.
36. Rottman JB, Freeman EB, Tonkonogy S, Tomkins MB. A reverse transcription-polymerase chain reaction technique to detect feline cytokine genes. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:1-18.
37. Gehad AE, Mashaly MM, Siegal HS, Dunnington EA, Siegel PB. Effect of genetic selection and MHC haplotypes on lymphocyte proliferation and Interleukin-2 like activity in chicken lines selected for high and low antibody production against sheep red blood cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;68:13-24.
38. Martínez-Arends A, Astoul E, Lafage M, Lafon M. Activation of human tonsil lymphocytes by rabies virus nucleocapsid superantigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:177-184.
39. Lillehoj HS, Choi KD, Jenkins MC, Vakharia VN, Song KD, Han JY, Lillehoj EP. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. *Avian Dis* 2000;44:379-389.
40. Xing Z, Schat KA. Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunol* 2000;100:70-76.
41. McElhaney JE, Gravenstein S, Upshaw CM, Hooton WJ, Krause P, Drinka P. Immune response to influenza vaccination in institutionalized elderly: effect on different T-cell subsets. *Vaccine* 1998;16:403-409.
42. Loza-Rubio E. Utilización de la proteína N del virus de la Rabia como inmunomodulador en vacunas de influenza aviar, y su evaluación inmunológica [tesis doctorado]. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.