

Evaluación de la presencia de receptores celulares al virus de Influenza Aviar en oviductos de aves sujetas a muda forzada usando inmunofluorescencia

Elizabeth Castillo-Villanueva¹

0000-0001-8161-5565

Félix Sánchez-Godoy²

0000-0002-8764-5762

Magdalena Escorcía^{2*}

0000-0002-3936-4907

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria, No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Cd. de México, 04510.

² Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria, No. 3000, Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, Cd. de México, 04510.

***Autor para correspondencia:**

Tel: + 52-55-56-22-58-68

Correo electrónico:

magdaesc@unam.mx

Resumen

Durante el 2012, un brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad ocasionado por el subtipo H7N3, en México, infectó y ocasionó la muerte o el sacrificio de alrededor de 22 millones de aves ponedoras. Durante este periodo, el principal desafío de los avicultores fue asegurar el flujo de comercialización del huevo. Además de los protocolos sanitarios y de vacunación, se implementaron manejos de muda forzada en la zona afectada. Este manejo aseguró el mantenimiento de la producción de huevo en zonas cuarentenadas, pues disminuyó la mortalidad de las parvadas infectadas y reestimuló el retorno a la producción normal de huevo. Para entender cómo la muda forzada redujo la mortalidad de las aves infectadas, examinamos la distribución del receptor del virus de Influenza Aviar en el oviducto de gallinas sujetas a muda forzada. Evaluamos si los cambios en el tracto reproductivo causado por la muda forzada disminuyen la expresión del receptor específico en la membrana celular. La presencia de receptores específicos determina la susceptibilidad del hospedador al virus de Influenza. Utilizamos la técnica de inmunofluorescencia con la lectina *Maackia amurensis* para identificar la presencia del receptor viral en cortes histológicos de oviductos de aves en producción y en oviductos de aves con muda forzada. Los resultados mostraron la presencia y distribución de los receptores a Influenza Aviar. Observamos una fuerte señal de los receptores en los cortes histológicos de los oviductos de aves en producción. Por el contrario, la señal fue baja en los oviductos de aves sometidas a muda. Estos resultados demuestran una disminución en el número de receptores de aves sometidas a muda forzada. La falta de receptores afecta la infección y la replicación del virus, así como los daños inducidos por el virus en el oviducto, lo que podría ayudar a explicar la observación en el campo de que las aves infectadas con Influenza Aviar y sometidas a muda forzada sobreviven más que las aves a las que no se les somete a muda.

Palabras clave: influenza aviar, inmunofluorescencia, muda forzada, oviducto, pelecha, producción de huevo.

Recibido: 2016-10-25

Aceptado: 2016-12-02

Publicado: 2017-02-17

Información y declaraciones adicionales en la página 8

© Derechos de autor:

Elizabeth Castillo-Villanueva et al. 2017

acceso abierto 

Distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Introducción

El 21 de junio de 2012, las autoridades mexicanas reportaron la presencia del virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) subtipo H7N3 en tres granjas de ponedoras comerciales en el estado de Jalisco, México. Las aves afectadas mostraron signos clínicos como plumas erizadas, letargo, anorexia, postración, depresión y muerte aguda.¹ Las edades de las aves infectadas fluctuaron entre las 32, 72, 75, 84 y 94 semanas de edad. Para prevenir la diseminación de la enfermedad, las autoridades sanitarias implementaron la cuarentena, la restricción de los movimientos tanto de los productos como de los subproductos en la zona donde se identificaron los brotes. Se inició la vigilancia epidemiológica para determinar la diseminación viral, el sacrificio humanitario de las aves sobrevivientes de las granjas afectadas y la desinfección de áreas o establecimientos infectados.²

A pesar de las medidas implementadas, el virus continuó diseminándose en diferentes granjas avícolas de la zona, así como en dos estados más de la República Mexicana.³ La infección afectó de manera importante a gallinas ponedoras, reproductores, y aunque en forma escasa, a granjas productoras de pollo de engorda. En el caso de ponedoras, y tras la implementación de la vacunación, las parvadas vacunadas e infectadas presentaban mortalidad baja, sin embargo, el impacto más negativo del virus, fue en los porcentajes de producción gallina-día, los cuales, una vez que descendían, no se recuperaban. El huevo presentaba mala calidad interna y externa, y estaba deforme.⁴ El primer paso para que el virus de Influenza infecte y se propague con éxito dentro de un huésped, es la unión de la Hemaglutinina (HA) a los receptores de superficie en la célula huésped, esta interacción ocurre con una afinidad y especificidad significativas.^{5,6} La presencia de receptores del virus de influenza en los órganos de las aves es vital para el éxito de la infección por el virus de influenza.⁵⁻⁷

En Jalisco, además de las medidas implementadas y ante el desafío de asegurar el flujo de comercialización del huevo, un producto de la canasta básica del mexicano, se tomaron medidas de manejo como la muda forzada en aves de zonas cuarentenadas.⁸ La muda forzada implica disminuir la ingesta calórica y la cantidad de horas luz a la que se exponen los animales para detener la producción de huevo. Con estos manejos, el tracto reproductor se rejuvenece y nuevamente vuelve a producir huevos.⁹

Los productores de huevos comerciales utilizan la muda para optimizar y sincronizar sus parvadas de ponedoras. Históricamente, las aves ponedoras producían durante un ciclo de postura y se les sacrificaba¹⁰; con la muda forzada, las aves ponedoras pueden tener un segundo ciclo de producción, ponen un huevo más grande y con un cascarón más resistente en comparación con los huevos producidos en el primer ciclo.

Grupos de aves vacunadas que comenzaron a experimentar mortalidad, de inmediato fueron sometidos a muda forzada; tanto la mortalidad como la producción de huevos se detuvieron. Después se volvió a estimular la producción y la tasa de producción de huevos de gallina-día aumentó hasta 90 %, a diferencia de la alta tasa de mortalidad que continuó en las parvadas vacunadas que iniciaron con mortalidad y no se sometieron a muda forzada, mostrando una tasa de producción de huevos gallina-día de 50 % o menos (comunicación personal del Dr. Ramón López). La muda forzada también evitó las deformidades de los huevos y preservó su calidad interna y externa.

La muda forzada es una práctica controversial debido a la percepción que se tiene en relación con los métodos para producirla. Esta práctica puede realizarse con manejos adecuados de cuidado animal que son mínimamente estresantes para las aves, con lo que se promueve con éxito la producción de huevos en situaciones de emergencia, como lo sucedido durante el brote de HPAI en México. Nuestro objetivo fue explicar por qué las aves infectadas con HPAI sometidas a muda forzada tuvieron tasas de mortalidad más bajas que las no sometidas a muda forzada.

Nuestra hipótesis fue que la muda forzada provocó atrofia fisiológica del aparato reproductivo del ave, lo que generó cambios en la densidad de receptores para el virus de la Influenza Aviar (IA) en el revestimiento del tracto reproductivo de las aves, lo que las protegió de la infección por el virus de la IAAP. Para demostrar esta hipótesis, determinamos si los cambios del tracto reproductivo causados por la muda forzada provocaban una disminución en la expresión del receptor específico al virus de IA. Tales efectos prevendrían la infección y la replicación con el virus de IAAP, esto permitiría a las aves alcanzar sus tasas de producción óptimas sin afectar la calidad interna y externa de los huevos.

Materiales y métodos

Colección de muestras

Para asegurar la ausencia de infección de IA en las parvadas de las que se obtuvieron las muestras para esta nota, todas las aves tanto en producción como las inducidas a muda forzada, se obtuvieron del estado de Nuevo León, estado identificado oficialmente como libre a IA tanto de baja patogenicidad como de alta patogenicidad de los subtipos H5N2 y H7N3 presentes en México.¹¹

Se obtuvo un grupo de 20 aves ponedoras sanas de 30 semanas de edad de la estirpe Bovans White en producción, denominado en lo sucesivo grupo en producción. Se les sacrificó de forma humanitaria con autorización del encargado de la granja,¹² y se les realizó la necropsia. Se recuperó el oviducto de cada una. Se obtuvieron cortes de la región del mágnum y del útero, que se incluyeron en solución de formalina buferada al 10 % para su posterior procesamiento. Solo se tomaron muestras de estas dos regiones, porque observamos que las ponedoras infectadas por el virus de IAAP H7N3 producían huevos con mala calidad de albúminas (mágnum) y mala calidad de mineralización (útero).¹³

Un segundo grupo, de aves en muda forzada, incluyó aves sanas de la estirpe Bovans White que concluyeron su primer ciclo de producción y a las que se les indujo a muda forzada (70 semanas de edad). Se seleccionaron 20 aves y se les practicó el sacrificio humanitario con autorización del encargado de la granja.¹² Se realizó la necropsia y se recuperaron los oviductos. Por la atrofia de los oviductos, las regiones de estos órganos no se pudieron diferenciar. Por esta razón, se obtuvieron cortes a diferentes distancias, que se incluyeron en solución de formalina buferada al 10 % para su posterior procesamiento.

Tinción de hematoxilina-eosina (HE)

Para visualizar las estructuras que forman las diferentes regiones de los oviductos y sus diferencias entre aves en producción y aves en muda forzada, los oviductos

de ambos grupos de aves de acuerdo con los protocolos establecidos se tiñeron con HE.¹³

Ensayo de Inmunofluorescencia (IF)

Para demostrar la presencia del receptor de IA, acoplamos al fluoróforo FITC (M 1061-50F) (US Biological Life Science, México)¹⁴ la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que reconoce específicamente el ácido siálico en una conformación α 2-3. Las muestras fijadas en formalina las incluimos en parafina y, a partir de este material, obtuvimos cortes de 3 μ m de grosor y las colocamos en portaobjetos cargados positivamente (Klingon HIER Slides, Biocare Medical, México). Mantuvimos los portaobjetos a 57 °C por dos horas. Desparafinamos las secciones mediante una incubación en xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación se rehidrataron mediante una serie graduada de etanol y agua. Después de la hidratación, las expusimos al antígeno de recuperación con 1X DIVA Decloaker (Biocare Medical, México) en una olla a presión durante 10 minutos.

Incubamos los portaobjetos durante la noche a 4 °C con FITC-MAA, que reconoce ácido siálico α 2-3, diluido 1:1000 en Da Vinci Green Diluent buffer (Biocare Medical, México). Los lavamos tres veces con 1X de PBS. Incubamos de nuevo los portaobjetos, ahora por 20 minutos con 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (DAPI; Sigma-Chemical, México) para teñir el núcleo celular.

Preparamos los portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® (Laboratorios Vector, México) y los examinamos con un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Para los controles negativos, reemplazamos la lectina MAA con 1X PBS y acoplamos un segundo anticuerpo al fluoróforo FITC (Alexa 488, Invitrogen, México).

Resultados y discusión

Los datos reportados a continuación los encontramos en todos los oviductos de las aves del estudio. En los cortes histológicos del grupo en producción, la mucosa del mágnium presentó epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado. Por debajo del epitelio, observamos glándulas tubulares secretoras con núcleos picnóticos basales y un citoplasma ocupado con gránulos acidófilos (figura 1A). En el útero, la mucosa presentaba un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado y por debajo una cantidad abundante de glándulas de la cáscara (figura 1B).

En los oviductos del grupo de muda forzada, notamos atrofia moderada caracterizada por pliegues de la mucosa pequeños y estrechos. El revestimiento epitelial disminuyó de tamaño, el material secretor en el citoplasma fue mínimo y solo hallamos unas pocas células caliciformes. En la porción glandular, detectamos glándulas escasas y poco desarrolladas caracterizadas por núcleos redondos eucromáticos con pequeñas cantidades de citoplasma, y una cantidad moderada de tejido conectivo (figuras 1C y 1D). Los resultados descritos anteriormente son consistentes con los resultados reportados por Eroschenko y Wilson.¹⁵

En la inmunofluorescencia, detectamos abundante expresión del receptor del virus de IA en las áreas apicales de las células de la mucosa del epitelio, en las células epiteliales de los ductos glandulares de las regiones de mágnium y de útero

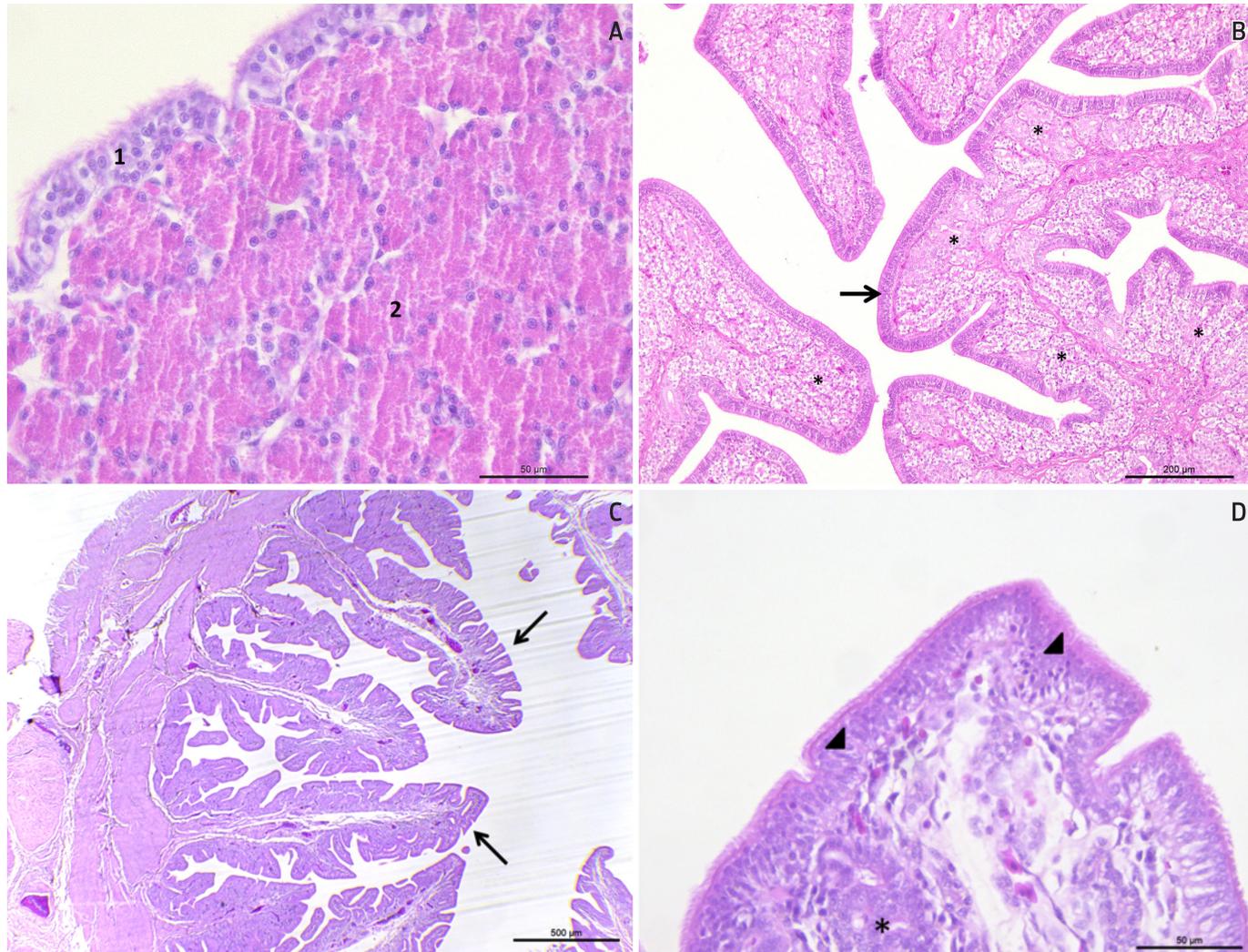


Figura 1. A. Fotografía de corte histológico de la región de magnum de gallinas sanas en producción. La mucosa presenta epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado (1), por debajo del epitelio, observamos glándulas tubulares secretoras con núcleos picnóticos basales y un citoplasma ocupado con gránulos acidófilos. Tinción HE. Barra: 50 µm. B. Fotografía de un corte histológico de la región del útero de gallinas sanas en producción. La mucosa (flecha) presentaba un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado y por debajo una cantidad abundante de glándulas de la cáscara con núcleos activos. Tinción HE. Barra: 200 µm. C. Fotografía de un corte histológico de oviducto de gallinas sanas, sometidas a muda forzada. Se observa atrofia de la mucosa, caracterizada por pliegues de la mucosa pequeños y estrechos (flecha). Tinción HE. Barra: 500 µm. D. Fotografía de un corte histológico de oviducto de gallinas sanas, sometidas a muda forzada. Se observa hiposecreción en revestimiento epitelial (cabeza de flecha). En la porción glandular detectamos glándulas escasas y poco desarrolladas (asterisco). Tinción HE. Barra: 50 µm.

del oviducto del grupo de aves en producción (figuras 2A y 2B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wang et al.¹⁶

En los oviductos de aves sometidas a muda forzada, hallamos una disminución de la intensidad de la señal del receptor al virus de IA en comparación con la señal en los oviductos de las aves en producción. Este fenómeno puede explicarse por la atrofia de este órgano como consecuencia de la muda forzada (figura 2C). La presencia de receptores en las células epiteliales de los conductos glandulares es la clave para la infección del tracto reproductivo por la viremia que sufre el virus de IA. Wang et al.¹⁶ realizaron un análisis de regresión lineal y mostraron que el coeficiente de correlación entre la presencia de receptores del virus de IA y la carga viral fue 0.9 con una pendiente de 3.5, lo que indica que estas variables están fuertemente asociadas.

En conjunto, las pruebas presentadas por Wang et al.¹⁶ y nuestros resultados, sugieren que en aves sometidas a muda forzada, el virus de la IA no es capaz de replicarse en el tracto reproductivo o se replica escasamente. Por lo tanto, en las aves sometidas a muda forzada, su carga viral fue baja, secundaria a la falta de receptores en su tracto reproductivo, lo que les permitió que los anticuerpos estimulados por la vacunación previa evitaran el daño en el oviducto y en la calidad del huevo. Estos resultados contrastan con los datos obtenidos para las aves que fueron vacunadas pero que no fueron sometidas a muda forzada. García et al.¹⁷ evaluaron la concentración antigénica de las vacunas emulsionadas, utilizadas para vacunar a las aves contra esta infección, y mostraron la importancia de la carga antigénica para inducir una inmunidad adecuada en los desafíos de campo. Una pregunta que queda pendiente de contestar es

¿qué cantidad de antígeno de IAAP es necesario para causar daño al tracto reproductivo de las aves vacunadas sujetas a muda forzada?

No podemos concluir definitivamente que nuestra hipótesis es correcta, se necesitan más investigaciones. Específicamente, el siguiente paso obvio en la prueba de nuestra hipótesis sería la infección controlada de la IA en aves sometidas a muda. Además, otra variable importante a evaluar es el número de dosis de vacunación que se necesitan para reducir el nivel de excreción viral de aves vacunadas sometidas a muda forzada e infectadas con IA bajo condiciones controladas.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que la muda forzada disminuyó la presencia y distribución del receptor del virus de Influenza Aviar en los oviductos de gallinas ponedoras. Estos resultados sugieren que un método para contrarrestar las infecciones ocasionadas por el virus de Influenza Aviar en gallinas en riesgo de exposición viral, es implementar la muda forzada, tal como se llevó a cabo en la zona de cuarentena de México durante el brote de IAAP en el verano de 2012.

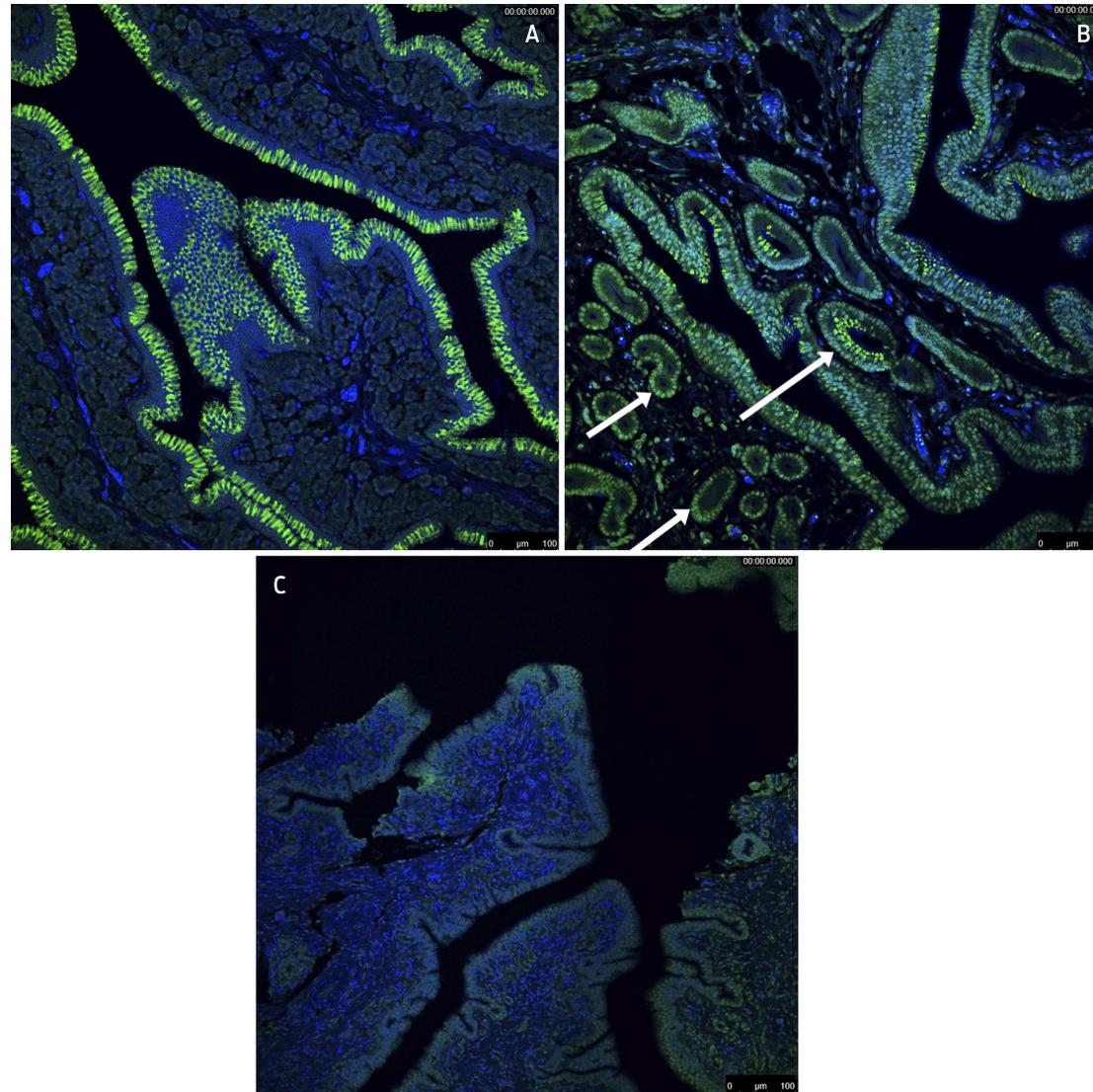


Figura 2. A. Se observa abundante expresión del receptor del virus de IA, marcado con fluorescencia verde manzana en las áreas apicales de las células de la mucosa del epitelio de la región del útero de oviductos de gallinas sanas en producción. Barra 100 μm . B. Receptores al virus de influenza (flechas), marcados por fluorescencia verde manzana, localizados en las células epiteliales de los ductos glandulares de la región de mágnun del oviducto del grupo de aves sanas en producción. Barra: 100 μm . C. Corte histológico de aves sanas sometidas a muda forzada. El receptor del virus de influenza, marcado con fluorescencia verde manzana, se observa en la región apical del epitelio de la mucosa; la intensidad de la fluorescencia es baja en intensidad a lo mostrado en la Figura 2A y 2B. Barr: 100 μm .

Financiamiento

Este estudio fue financiado por CONACYT: SALUD 2009-CO2-126619. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Los autores agradecen al MVZ Ramón López por su invaluable apoyo al permitirnos acceder a los registros de producción de las parvadas de ponedoras comerciales infectadas, y al MVZ Carlos Cubillas y MVZ Daniel Juárez Pérez, quienes nos ayudaron a obtener los órganos con los que se realizaron las técnicas que nos permitieron obtener los resultados publicados. Agradecemos a los técnicos María J.I Gomora, V Rodríguez-Mata y M Peña Rico por la asistencia técnica en el proceso histológico. Finalmente, agradecemos a la Dra. Patti Miller por los comentarios al manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

Contribución de los autores

Magdalena Escorcía dirigió la investigación, diseñó la fase experimental del trabajo, analizó los datos y escribió parte del manuscrito. Elizabeth Castillo-Villanueva interpretó los resultados y escribió parte del manuscrito, y Félix Sánchez-Godoy interpretó los resultados y escribió parte del manuscrito.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2012 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012/].
2. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo Sanitario para la Erradicación de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad H7N3. In: SAGARPA, editor. México D F: Secretaría de Gobernación; 2013.
3. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2013 [Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2013/>].
4. Kapczynski DR, Patin-Jackwood M, Guzman SG, Ricardez Y, Spackmen E, Bertran K, et al. Characterization of the 2012 highly pathogenic avian influenza H7N3 virus isolated from poultry in an outbreak in Mexico: Pathobiology and vaccine protection. *J Virol.* 2013;87(16):9086-96. doi: 10.1128/JVI.00666-13.
5. Fouchier RA, Kawaoka Y, Cardona C, Compans RW, García-Sastre A, Govorkova EA, et al. Gain-of-function experiments on H7N9. *Science.* 2013;341(6146):612-3. doi: 10.1126/science.341.6146.612.
6. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
7. Sasaki GL, Elli S, Rudd TR, Macchi E, Yates EA, Naggi A, et al. Human (α 2,6) and avian (α 2,3) sialylated receptors of Influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry.* 2013;52:7217-30. doi: 10.1021/bi400677n.
8. INEGI. Índice Nacional de Precios al Consumidor. In: Geografía INdEy, editor. México D. F.2016.

9. Sariözkan S, Güçlü BK, Kara K, Gürçan S. Comparison of different molting methods and evaluation of the effects of postmolt diets supplemented with humate and carnitine on performance, egg quality, and profitability of laying hens. *J App Poult Res.* 2013;22(4):689-99. doi: 10.3382/japr.2012-00612.
10. Bell DD. Historical and current molting practices in the U.S. table egg industry. *Poult Sci.* 2003;82:965-70.
11. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2016 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/].
12. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
13. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology* (Armed Forces Institute of Pathology). Washington D C, USA: American Registry of Pathology; 1992. 279 p.
14. França M, Stallknecht DE, Howerth EW. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol.* 2013;42(1):60-71. doi: 10.1080/03079457.2012.759176.
15. Eroschenko VP, Wilson WO. Histological changes in the regressing reproductive organs of sexually mature male and female Japanese quail. *Biol Reprod.* 1974;11:168-79.
16. Wang JY, Chen ZL, Li CS, Cao X, Wang R, Tang C, et al. The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes.* 2015;29:129-34. doi: 10.1016/j.mcp.2015.01.002.
17. García A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Que-retaro/19/95 infection. *Avian Dis.* 1998;42(2):248-56.