



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Influencia de la Dehidroepiandrosterona (DHEA)
Sobre la Bursa de Fabricio de Pollos Recién Nacidos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :

BIOL. ROSARIO ORTIZ HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE A. PEDERNEA ASTEGIANO.



MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258429



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

Gracias

A Dios "Por la gracia de Dios soy lo que soy..."

A Miguel Ángel mi ayuda idónea, por su amor, su compañía y comprensión, siempre incondicional que me animan en todo momento y me alientan a seguir adelante.

A mi mami por su amor que ha mostrado durante toda mi vida y su ejemplo de trabajo.

A la memoria de mi padre.

A mis hermanos, Pilar, Toño, Tito y Ale por apoyarme siempre en las buenas y en las malas.

A mis sobrinos por ser genuinos en la manera de mostrar su afecto.

A mi familia Berith por su amor fraternal.

A mis amigos Paty, Lety, Rosy, Silvia, Gabriel y Francisco por alentarme y escucharme en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Enrique Pedemera A. por brindarme la oportunidad de crecer académicamente y haberme conducido pacientemente en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Olga M. Echeverría Martínez por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A el Dr. Gerardo H. Vázquez Nin por sus conocimientos y consejos que fueron siempre enriquecedores para el termino de este trabajo.

A la Dra. Emma I. Melendro y Dr. Carlos Valverde por sus críticas y sugerencias, durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su apoyo, orientación y amistad constantes que fueron significativos.

A los miembros del jurado, Dr. Luis Felipe Jiménez García y Dr. Andrés Elio Castell por sus oportunas sugerencias y valiosas opiniones para el trabajo.

A la M. en C. Berta Chávez por asesorarme en los estudios bioquímicos y compartir su experiencia profesional.

A la Dra. Vilma Maldonado y M. en C. Jorge Melendez por su incondicional apoyo para concretar los resultados obtenidos.

A la Biol. Ma. de Lourdes Barbosa por su asistencia en la parte estadística.

A la Biol. Diana Alicia Millan por su apoyo técnico.

A el personal del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microscopía Electrónica, de quienes recibí siempre su apoyo en el momento oportuno.

ÍNDICE

I.- Resumen.....	1
II.- Introducción	
II 1. Anatomía de la bursa de Fabricio.....	2
II 2. Organización histológica de la bursa de Fabricio.....	4
II 3. Organización del folículo linfoide.....	8
II 4. Ontogenia de la bursa de Fabricio.....	17
II 5. Involución de la bursa de Fabricio.....	27
II 6. Función de la bursa de Fabricio.....	28
II 7. Biosíntesis de esteroides.....	38
II 8. Relación de la bursa de Fabricio con las hormonas esteroides.....	47
II 9. Función de la dehidroepiandrosterona (DHEA).....	49
II 10. Relación de la DHEA con el sistema inmunológico.....	53
III. Planteamiento del problema.....	56
IV. Objetivos.....	57
V. Materiales y Métodos.....	59
V 1. Determinación del ADN total.....	59

V 2. Determinación del proteínas.....	61
V 3. Procesamiento del material biológico para microscopia óptica.....	62
V 4. Estudios morfométricos por microscopia óptica.....	63
V 5. Estudios de captación de tinta china	65
V 6. Análisis estadísticos.....	66
VI. Resultados	
VI 1. Determinación del ADN total.....	67
VI 2. Determinación de proteínas totales.....	67
VI 3. Estudios morfológicos con microscopia óptica.....	72
VI 4. Estudios morfométricos con microscopia óptica.....	75
VI 5. Estudios de captación de tinta china.....	88
VII. Discusión.....	90
VIII. Conclusiones.....	103
IX. Fotomicrografías.....	104
X. Bibliografía consultada.....	124

Abreviaturas empleadas

ANAE	5 α -acetato naftil esterasa
ANOVA	análisis de varianza
BASP	péptido antiesteroideogénico bursal
BDL	ligado del conducto bursal
B-L	moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad de pollos equivalente al Ia ⁺ en ratones
BSA	albumina de suero bovino
CB	células corticales
CBLA	antígeno de linfocitos maduros B
CBRFA	antígeno para fibras reticulares
CFAA	antígeno fetal asociado a células hematopoyéticas
CG	glucocorticoides
CL-I ⁺	antígeno de superficie de los linajes hematopoyéticos de pollo
CYP4A	citocromo p-450 4A
3,5-DABA	dehidroclorato de ácido 3,5- diamino benzoico
DHEA	dehidroepiandrosterona
DHEAS	sulfato de dehidroepiandrosterona
F	fibroblastos
FAE	células epiteliales asociadas al folículo
FIV	virus de inmunodeficiencia felina
Ia ⁺	moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad de ratón
IFE	epitelio interfolicular
IFN	interferon
Ig	inmunoglobulinas
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
Igs	inmunoglobulinas superficiales
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
L22 ⁺	proteína de 70kDa de linfocitos de bursa de pollo

LH	hormona luteinizante
Ma	macrófagos
MANOVA	análisis multivariado
MB	membrana basal
Me	células medulares epiteliales
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MUI 51	anticuerpo monoclonal que reacciona con las células interfoliculares de la bursa de Fabricio de pollos adultos
MUI 73	anticuerpo monoclonal que reacciona con la membrana basal asociada al epitelio de la bursa de Fabricio de pollos adultos
Rep	células reticuloepiteliales
SDC	células dendríticas secretoras
TCA	ácido tricloroacético
TCR	receptor de células T

I. Resumen

La bursa de Fabricio es un órgano linfoide exclusivo de las aves. Su función principal es la formación, proliferación y maduración de linfocitos B. La dehidroepiandrosterona (DHEA) en mamíferos, es el principal andrógeno secretado por la glándula adrenal embrionaria, que en los adultos mantiene concentraciones importantes y tiene una función reguladora sobre la respuesta inmunológica y un efecto antagónico a los glucocorticoides. El objetivo de este trabajo es el de conocer si la DHEA tiene un efecto en la bursa de Fabricio. Por ello se valora el efecto de la DHEA sobre algunas de las poblaciones celulares del folículo linfoide de la bursa de Fabricio de pollos recién nacidos, mediante estudios morfológicos morfométricos y bioquímicos. Se trabajaron dos grupos de embriones de pollo, testigos y tratados con una solución de DHEA (120 mg/ml) en etanol al 30% que se aplicó antes de iniciar la incubación. Se midió el peso húmedo de las bursas, la cantidad de ADN y de proteínas totales. En los folículos linfoides se midió el área del botón de células epiteliales asociadas al folículo (FAE), se contó el número de linfocitos y mitosis, el número de células en apoptosis por folículo y el número de células Ia^+ (células dendríticas secretoras) por folículo, y se midió el diámetro mayor y menor de los folículos linfoides, así como la captación de tinta china por las células FAE. Los resultados muestran que los animales tratados con DHEA tienen un incremento significativo en el área de los botones epiteliales de las células FAE y una disminución significativa en el número de linfocitos en apoptosis por folículo linfoide. El porcentaje de captación de tinta china por las células FAE en los animales tratados con DHEA es mayor (80%). El aumento significativo en el área de los botones epiteliales en los organismos tratados con DHEA, concuerda con el incremento en la captación de tinta china por las células FAE, ya que la función de las células FAE es fagocitar antígenos lumbales para introducirlos al folículo linfoide. La disminución en la apoptosis sugiere que existen factores que proporcionan el micro ambiente adecuado para que los linfocitos B sufran una selección positiva. Este mecanismo podría estar mediado por las células dendríticas secretoras (Ia^+) ya que son las responsables de crear el microambiente necesario para la proliferación, maduración y diferenciación de los linfocitos B, debido a que mostraron una morfología más dendrítica y una distribución más amplia en toda la región medular en los animales tratados con DHEA. Estos resultados sugieren que las células FAE, las células dendríticas secretoras y los linfocitos B de los folículos linfoides de la bursa de Fabricio presentan cambios dependientes de la DHEA, la que probablemente tiene una función inmunoreguladora.

II 1. Anatomía de la bursa de Fabricio

La bursa de Fabricio es un órgano linfoide exclusivo de las aves localizado en la porción distal de la cloaca (Figura 1 y 2). Este órgano fue inicialmente descrito por Fabricio en 1651. Su papel inmunológico está claramente establecido desde que Glick y colaboradores (1956) demostraron una deficiencia en la formación de anticuerpos en pollos provocada por la bursectomía antes del nacimiento.

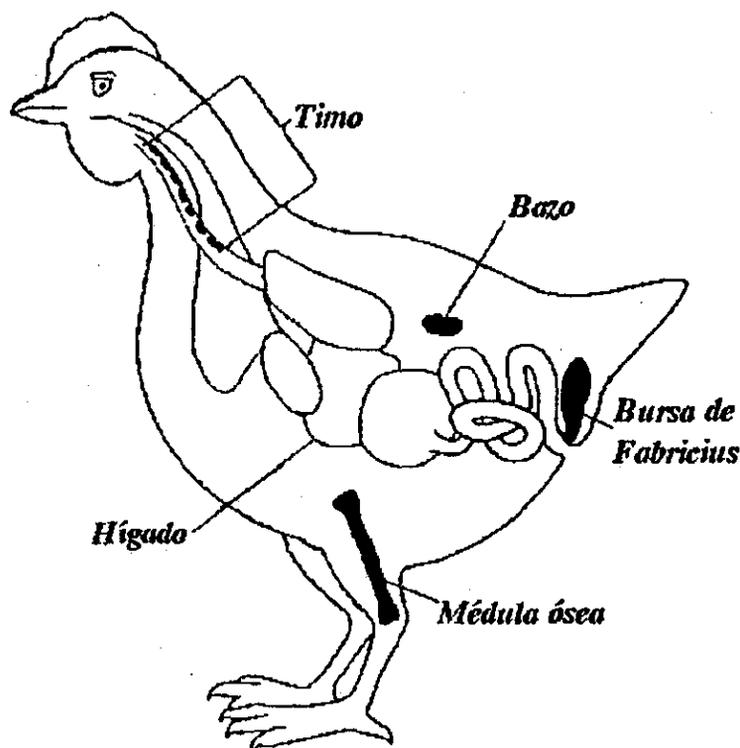


Figura 1. El sistema inmunológico de las aves en las primeras etapas de la vida, está centralizado en el timo y la bursa de Fabricio. El timo consiste de siete lóbulos, que descansan sobre la tráquea y controla el desarrollo de la inmunidad mediada por células. La bursa es una bolsa o saco, que se encuentra unida al intestino cerca de la cloaca, y es la responsable de la formación de las células encargadas de la respuesta inmunológica humoral. Los linfocitos formados en estos dos órganos linfoides colonizan la médula ósea y el bazo (Tomada de Cooper y Lawton, 1974).

La bursa está unida al *proctodeum* de la cloaca por un pequeño tallo el cual en algunas aves puede estar ausente (Farner y King 1973; Zapata y Cooper, 1990)

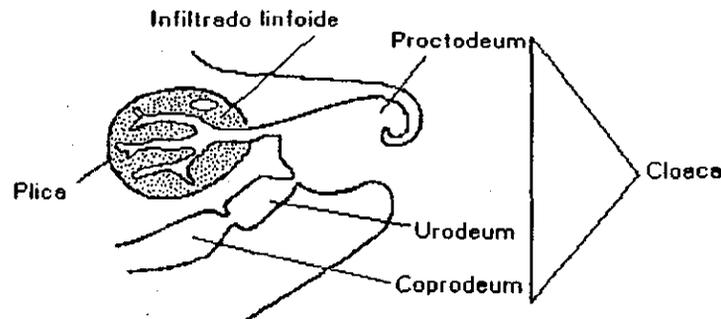


Figura 2. Esquema que muestra la localización anatómica de la bursa de Fabricio en la cloaca de las aves. Existe la presencia de infiltrado linfóide en el área del conducto bursal. (Tomada de Zapata y Cooper, 1990).

Externamente, está cubierta por una capa de tejido conjuntivo. La bursa está constituida por 12 a 15 plicas que se dirigen hacia la luz del órgano. Dentro de las plicas existe tejido linfóide que se organizan en forma de folículos. En la cuarta semana de vida de los pollos existe un promedio de 820 folículos linfoides en cada pliegue. La mayoría de los vasos sanguíneos que nutren a la bursa se derivan de la arteria pudenda interna, la cual lleva el mayor aporte sanguíneo a la bursa. Existe un aporte sanguíneo adicional por la arteria mesentérica; la vena pudenda interna y la vena mesentérica posterior recogen la sangre de las vénulas de la bursa. Los vasos linfáticos que drenan la bursa siguen a la arteria media sacra y la arteria pudenda común, aunque los vasos linfáticos al parecer nunca entran en los folículos linfoides. La innervación proviene de fibras nerviosas simpáticas del nervio pélvico y del nervio intestinal que entran al ganglio bursal cloacal en su polo anterior. Algunas

fibras entran a un segundo ganglio bursal y fibras postganglionares penetran a la bursa donde terminan en los plexos perivasculares (Glick 1977; Zapata y Cooper, 1990).

H 2. Organización Histológica de la Bursa de Fabricio

La Bursa de Fabricio está constituida por cuatro capas básicas que de la periferia hacia la parte interna son:

- 1.- Capa serosa delgada constituida por tejido conjuntivo y un epitelio plano simple.
- 2.- Capa muscular formada por músculo liso arreglado en forma circular o por una capa externa de fibras musculares longitudinales y una capa interna de fibras musculares circulares. La capa de tejido muscular varia de grosor.
- 3.- La submucosa está muy reducida en el interior de las plicas y es difícil distinguir entre la submucosa y la lamina propia de las plicas. Las plicas en su interior están constituidas por dos componentes: La trama de tejido conjuntivo de la lámina propia y los folículos linfoides. El tejido conjuntivo básicamente consiste de una fina red de fibras de colágena y numerosas fibras reticulares rodeando a los folículos linfoides. Los folículos linfoides ocupan una buena parte dentro de las plicas. Los folículos presentan una forma que va de ovoide a poliédrica y están constituidos por una región medular y una región cortical que se

encuentran separadas por una membrana basal bien definida que tiene continuidad con la membrana basal del epitelio de revestimiento, interrumpiéndose solamente en las porciones en las que se localizan las células FAE. Así la médula está en contacto directo con las células FAE (Ackerman, 1962; Frasier, 1974; Hodges, 1974; Zapata y Cooper, 1990).

En la región medular del folículo linfoide están presentes linfoblastos y linfocitos inmersos en un estroma constituido por las prolongaciones citoplasmáticas de las células reticuloepiteliales (Rep), las que se encuentran unidas por desmosomas (Zapata y Cooper, 1990). Además de las células linfoides, también se encuentran macrófagos y células dendríticas en la región medular del folículo. En la periferia, entre la región medular y cortical existe una capa de células epiteliales que limitan estos dos compartimentos junto con la membrana basal. En la médula no existen vasos sanguíneos ni células mesenquimatosas (Frasier, 1974; Paniagua y Nistal, 1983).

La corteza está formada hasta por diez capas de linfocitos B, entre las que se disponen algunas células epiteliales y en menor número células mesenquimatosas de la lámina propia. No hay uniones intercelulares entre los linfocitos, ni entre éstos y las células epiteliales. La formación de los linfocitos es inversa a la del timo, pues los linfocitos proliferan en la región medular y pasan a la corteza para abandonar la bursa (Paniagua y Nistal 1983). En la corteza, la red celular es continua con el tejido conjuntivo que rodea al folículo. La corteza se tiñe más intensamente que la médula debido a que está constituida por una gran cantidad de células. En la corteza los vasos sanguíneos están frecuentemente asociados con la

membrana basal (Frasier, 1974; Hodges, 1974), la cual deja pequeñas fenestraciones por las que se da una salida continua de linfocitos. Existen estudios en los que se ha seguido el crecimiento de la corteza y médula durante los períodos embrionario y postnatal y se ha encontrado que el crecimiento es alométrico, esto es, que durante la vida embrionaria la médula crece a un ritmo menos acelerado con relación a la región cortical, y durante el período postnatal el crecimiento de estos dos compartimentos tiende a igualarse debido a que la corteza disminuye su tasa de crecimiento (Betti *et al.*, 1991). Por esta diferencia en el crecimiento de la región cortical y medular del folículo linfóide se ha propuesto la existencia de dos períodos de crecimiento y la posibilidad de que estos dos compartimentos realicen funciones distintas (Figura 3) (Rompanen, 1982; Betti *et al.*, 1991; De Azevedo y Betti, 1993).

4.- Epitelio superficial que está constituido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, donde se pueden distinguir dos diferentes tipos de epitelios, un epitelio secretor de moco denominado epitelio interfolicular (IFE) y las FAE, las cuales poseen capacidad fagocítica (Figura 3) (Hodges, 1974; Zapata y Cooper, 1990).

El porcentaje de folículos linfoides totales en el tejido bursal se incrementa del día cuatro postnatal al día 62 a un 86 por ciento para el día 63 y posteriormente decrece lentamente hasta el día 84. Los valores correspondientes al estroma bursal y al epitelio decrecen del día cuatro al 84. Las cantidades absolutas y relativas del tejido linfóide se incrementan con el desarrollo de folículos linfoides individuales y su diámetro espacial promedio se incrementa

del día cuatro al 84. El número de áreas del epitelio asociado al folículo en la mucosa de la bursa, corresponde al número de folículos, el cual en una bursa madura permanece relativamente sin cambios. La corteza folicular crece más rápidamente que la médula folicular, lo cual indica diferentes funciones para cada una (Romppanen, 1982).

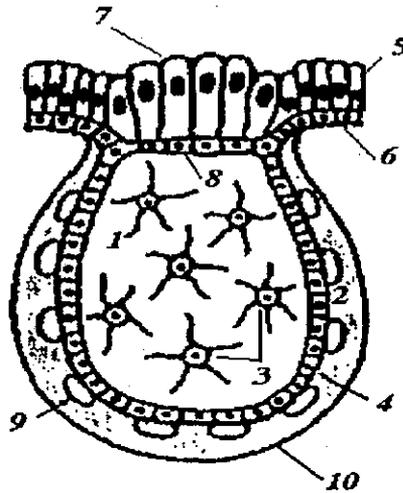


Figura 3. Esquema de un folículo linfático de la Bursa de Fabricio. 1 Médula; 2 Corteza; 3 Células reticuloepiteliales con sus prolongaciones citoplasmáticas (Rep); 4 Borde corticomedular constituido por células epiteliales; 5 Epitelio interfolicular (IFE) o de revestimiento; 6 Membrana basal del epitelio interfolicular IFE; 7 Botón de células epiteliales asociadas al folículo (FAE); 8 Células de soporte de las células FAE (estratificado); 9 Vasos sanguíneos; 10 Fibras reticulares que delimitan a cada folículo linfático. (Tomada de Bläuer y Tuohimaa, 1995).

La pared dorsal del canal central de la bursa de algunas aves presenta tejido linfático sin un arreglo folicular, y se le ha denominado tejido linfático infiltrado difuso (Figura 2). Este tejido aparece en los pollos después del nacimiento y existen evidencias de que se trata de zonas T dependientes (Cortés *et al.*, 1995).

II 3. Organización del folículo linfoide

El folículo linfoide está constituido por las siguientes células: células epiteliales asociadas al folículo (FAE), células reticuloepiteliales (Rep), células dendríticas secretoras (SDC), macrófagos, células plasmáticas, linfoblastos y linfocitos (Figura 4) (Oláh y Glick, 1992a). Cabe señalar que la nomenclatura para referirse a los tipos celulares que constituyen el folículo linfoide de la bursa varía, dependiendo del grupo de investigadores (Cuadro 1).

Las células asociadas a los folículos (FAE) son células cilíndricas, con microvellosidades cortas en el borde apical, con un núcleo pálido por su eucromatina. Estas células se encuentran unidas entre sí por desmosomas. Carecen de membrana basal y están insertadas de manera discontinua a lo largo de la superficie epitelial de la plica, por lo que la superficie basal de las FAE está en contacto con las células reticuloepiteliales (Figura 3 y 4), que forman el estroma reticular de la médula. Los antecedentes bibliográficos clásicos sostienen que las FAE tienen un origen endodérmico, pero otros investigadores, principalmente Lupetti y colaboradores (1990) postulan que son células de origen mesenquimatoso, debido a que tienen características en común con las células de este origen: 1.- Aparecen en el borde epitelial después de la migración de la unidad formadora de colonias (Glick, 1977). 2.- No presentan membrana basal (Hodges, 1974). 3.- Son altamente esterasa positivas y presentan actividad micropinocítica (Bockman y Cooper, 1973, Lupetti y Dolfi, 1980). 4.- Como los macrófagos, son sensibles a la carragenina y a la sílica (Dolfi *et al.*, 1981). 5.- Muestran una avidez notable por captar tinta china, ferritina y partículas de látex, entre otras (Naukkarinen y Sorvari, 1984) y, finalmente, 6.- Presentan un fenotipo distinto a las demás células epiteliales al utilizar anticuerpos monoclonales, ya que las células FAE son

positivas a MUI 51 y MUI 73, (Lupetti *et al.*, 1990). El epitelio asociado al folículo es capaz de fagocitar tinta hasta las 16 semanas (Naukkarinen y Sorvari, 1984).

Las células reticuloepiteliales (Rep) constituyen el estroma de la médula folicular. Son células estrelladas que forman una red con sus largas e irregulares prolongaciones citoplasmicas unidas unas con otras por desmosomas. Las células Rep varían en tamaño y forma, aunque los procesos citoplásmicos largos son siempre típicos. El núcleo es generalmente ovoide con pequeñas indentaciones, uno o dos nucleolos y cromatina condensada en la periferia. En el citoplasma se presentan pequeñas vacuolas, ribosomas generalmente formando polirribosomas, pocas mitocondrias, escaso retículo endoplasmico rugoso y un aparato de Golgi pequeño. En las prolongaciones citoplásmicas se aprecian haces de tonofilamentos (Naukkarinen y Sorvari, 1982; Zapata y Cooper, 1990). Los linfocitos frecuentemente se observan en contacto con las extensiones de las células Rep (Ackerman, 1962; Naukkarinen y Sorvari, 1982; Zapata y Cooper, 1990).

Frasier (1974) describió dos tipos de células Rep ubicadas en la porción medular, a las que denominó células epiteliales reticulares pálidas y oscuras. Otros autores han descrito células con características morfológicas semejantes a las células Rep y les han asignado diferentes nombres. En este sentido Ackerman (1962) las describe como células epiteliales endodermales; Naukkarinen y Sorvari (1982) como células dendríticas reticulares y Betti y colaboradores (1991) las denominan como células epiteliales medulares (Cuadro 1).

Cuadro 1
Nomenclatura utilizada para denominar a las diferentes poblaciones celulares del foliculo linfoide

Región folicular	Nombre de la célula	Autor
Médula	Célula epitelial superficial de la médula	Aramaki, 1968
	Célula epitelial arreglada en la unión corticomedular	Lorvik <i>et al.</i> , 1971
	Célula reticulo-epitelial en estrecha relación con la lámina basal	Frasier, 1974
	Células epiteliales asociadas a la membrana basal	Eerola, 1980
	Células epiteliales foliculares	Naukkarinen y Sorvari, 1982
	Células epiteliales del borde cortico-medular	Lupetti <i>et al.</i> , 1990
	Células basales	Betti <i>et al.</i> , 1991
	Células epiteliales reticulares	Aramaki, 1968
	Células epiteliales de la red reticular	Lorvik <i>et al.</i> , 1971
	Células epiteliales estrelladas	Frasier, 1974
Corteza	Células reticulares epiteliales pálidas y oscuras	Eerola, 1980
	Células reticuloepiteliales (Rep)	Naukkarinen y Sorvari, 1982
	Células reticulares dendríticas	Lupetti <i>et al.</i> , 1990
	Células epiteliales medulares	Betti <i>et al.</i> , 1991
	Células epiteliales reticulares de la corteza	Aramaki, 1968
	Células epiteliales reticulares pálidas y oscuras	Frasier, 1974
	Células reticulares oscuras pequeñas	Frasier, 1974
Células corticales ramificadas	Betti <i>et al.</i> , 1991	

(Tomado de Betti *et al.*, 1991).

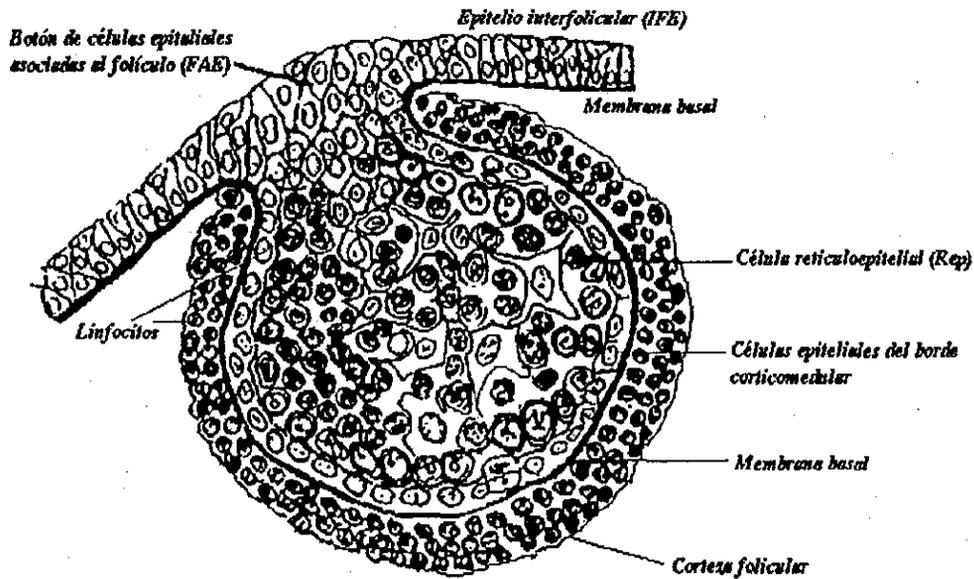


Figura 4. Estructura histológica de un folículo linfóide maduro. La médula del folículo (centro) contiene células retículoepiteliales (Rep), las que se mezclan con los linfocitos y macrófagos. La región medular está rodeada por una capa, a manera de bolsa, de células epiteliales y una membrana basal, la cual separa la región medular de la cortical, ésta última contiene linfocitos densamente empaquetados (Tomada de Pink y Lassila, 1987).

Recientemente se ha demostrado que las células Rep son células positivas a la citoqueratina y al antígeno B-L (moléculas clase II del MHC de pollos semejantes al Ia⁺) (Hoshi *et al.*, 1988; Zapata y Cooper, 1990; Lupetti, *et al.*, 1990; Oláh y Glick, 1992b). Por lo que se plantea que las células Rep tienen un papel funcional muy importante junto con las células FAE creando un ambiente adecuado para la maduración de las células linfoides (Hoshi *et al.*, 1988; Lupetti, *et al.*, 1990).

En el borde corticomedular (figura 4 y 5), junto a la membrana basal se localizan las células Rep pálidas (Zapata y Cooper, 1990) o células epiteliales foliculares (Cuadro 1) (Naukarinen y Sorvari, 1982) formando una capa de células que se encuentran unidas por

desmosomas. Estas células presentan una morfología y tamaño muy regular siendo generalmente alargadas, con un núcleo grande y central, y uno a tres nucleolos. con gran cantidad de filamentos en su citoplasma y desmosomas. Estas células no tienen capacidad fagocítica y expresan una débil actividad intracitoplásmica a la 5 α -acetato naftil esterasa (ANAE) y a la 5-nucleosidasa. La reacción a fosfatasa ácida es negativa (Naukkarinen y Sorvari, 1982).

Se ha descrito otro tipo celular epitelial que se presenta en ocasiones en la médula del folículo linfóide formando una estructura semejante al corpúsculo de *Hassall* del timo (Naukkarinen y Sorvari, 1982; Zapata y Cooper, 1990). De acuerdo con los estudios realizados por Oláh y Glick (1992a), esta estructura epitelial está constituida por células de soporte de las células FAE, que sufren una invaginación hacia el interior del folículo. El momento en el cual se da dicha invaginación varía de folículo a folículo. La formación de esta estructura semejante al corpúsculo de *Hassall* del timo se ha interpretado como signo de involución de la bursa (Naukkarinen *et al.*, 1978; Oláh y Glick, 1992a). Cuando se administra tinta china por la cloaca a los pollos, después de cierto tiempo, puede ser vista en el centro de esta estructura parecida al corpúsculo de *Hassall* (Naukkarinen y Sorvari, 1982; Zapata y Cooper, 1990).

Se ha descrito también una población de células dendríticas en la región medular, generalmente paralelas al borde corticomedular de los folículos linfoides, que también se conocen como células dendríticas secretoras (SDC), basándose en evidencias morfológicas

(Oláh y Glick, 1978a), o como células epiteliales basales (Ba) (Betti *et al.*, 1991) (Cuadro 1).

En general las SDC o células epiteliales basales (Ba) son células de forma alargada, con un patrón en la cromatina similar a la de los linfocitos. El citoplasma es oscuro y presenta uno o dos procesos citoplásmicos largos y gruesos que contienen gránulos más o menos de un micrómetro de espesor (Figura 5). Las células tienen una alta afinidad por el azul de toluidina. Expresan una proteína en el citoesqueleto tipo vimentina similar a la de las células dendríticas foliculares de los centros germinales del bazo, pero no presentan positividad a la desmina, lo cual es común encontrar en las células de origen mesenquimatoso (Oláh y Glick, 1986 y 1995). Las células SDC expresan moléculas clase II del complejo MHC (Ia para el ratón y B-L para aves). No presentan reacción positiva a la esterasa y a la peroxidasa y tampoco presentan capacidad fagocítica como los macrófagos (Oláh y Glick, 1992b).

El tratamiento con carragenina disminuye el número de las SDC y provoca alteraciones morfológicas caracterizadas por la presencia de vacuolas en la periferia del citoplasma asociadas con una disminución en el número de gránulos de secreción y una membrana plasmática arrugada. Al combinarse el tratamiento con carragenina y la inmunización con *Salmonella*, Oláh y Glick (1986) encontraron que además de las modificaciones anteriores, las células SDC presentan características de células inmaduras y se observan en la periferia de la médula folicular además de ser mas abundantes que las células SDC maduras.

Otra sustancia con la que se puede alterar a las células del folículo linfoide es la ciclofosfamida, que provoca una disminución en los linfocitos y atrofia severa del folículo linfoide. Sin embargo, las células SDC resisten el tratamiento a este fármaco, incluso durante el desarrollo embrionario (Wilson y Boyd, 1990; Marsh y Glick, 1992).

Varias investigaciones han sugerido que las células dendríticas secretoras de la bursa participan en la diferenciación de los linfocitos B de la bursa, así como una participación en el encendido rápido de la IgM-IgG (Oláh y Glick, 1986; Oláh y Glick, 1987). Durante la histogénesis del folículo linfoide se presentan unas células mesenquimatosas oscuras que se piensa son las precursoras de las células SDC y que podrían ser las responsables de inducir la formación del folículo linfoide (Glick 1995; Glick y Oláh, 1993a y b).

Otro tipo celular que se encuentra en el folículo linfoide son los macrófagos, localizados en la corteza y en la médula (figura 5) (Betti *et al.*, 1991). Cuando los macrófagos se localizan en la médula se les conoce como células dendríticas histiocíticas. Las células histiocíticas tienen aspecto alargado y presentan algunas prolongaciones citoplásmicas gruesas entre las otras células de la médula. El núcleo puede ser ovoide o esférico; contiene cromatina ligeramente electrodensa que ocasionalmente puede presentar condensaciones asociadas a la envoltura nuclear. Se han observado algunos organelos como numerosas mitocondrias y ribosomas, cisternas de retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado. Sin embargo, la principal característica son los grandes fagosomas con restos celulares o carbón. Las células histiocíticas se tiñen intensamente para la fosfatasa ácida y ANAE. La

reacción para la 5-nucleosidasa es negativa (Naukkarinen y Sorvari, 1982). Algunos autores proponen que estas células histiocíticas de la médula folicular son semejantes o idénticas a los macrófagos del centro germinativo (Zapata y Cooper, 1990). Niedorf y Wolters (1974) demostraron que los macrófagos de la bursa de embriones y de pollos jóvenes migran de la corteza a la zona medular y alcanzan la luz a través de las células FAE (Zapata y Cooper, 1990).

Los linfocitos medianos y grandes son los elementos predominantes en el folículo linfoide y se localizan principalmente en la periferia de la médula de la bursa (Figura 4) (Zapata y Cooper, 1990). En el centro de la médula los linfocitos están organizados densamente y se encuentran situados entre las células reticulares y rodeados por el epitelio corticomedular. Su escaso citoplasma está lleno de ribosomas, pocas mitocondrias y el aparato de Golgi. La membrana celular es frecuentemente lisa. El núcleo es esférico u oval, el cual contiene un pequeño nucleolo es central o asociado a la envoltura nuclear. Los linfocitos no presentan actividad de 5-nucleosidasa. Ocasionalmente, células con apariencia de linfocitos muestran actividad 5- α acetato naftil esterasa (ANAE), sin embargo en la mayoría de los linfocitos de la porción medular son ANAE negativos (Naukkarinen y Sorvari, 1984).

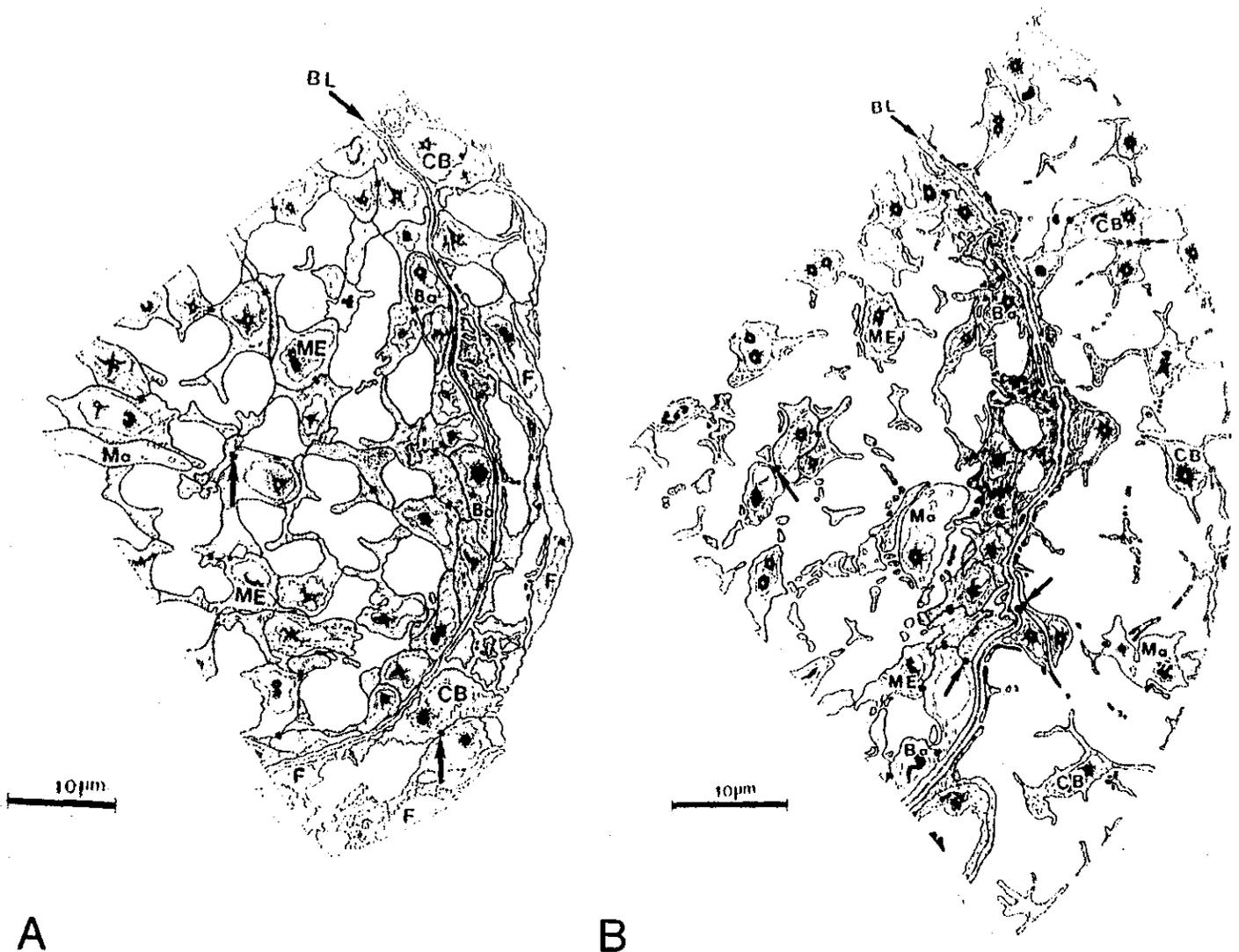


Figura 5. Esquemas que muestran la disposición de algunas de los tipos celulares contenidos en las diferentes regiones del folículo linfoide. A) Folículo linfoide de un embrión de pollo de 17 días de desarrollo embrionario, la región cortical muestra células corticales ramificadas (CB) y fibroblastos (F); el borde corticomédular está constituido por las células epiteliales basales (Ba) que están en contacto con la lamina basal (BL), la región medular contiene células epiteliales medulares (Me) unidas entre ellas por desmosomas (\rightarrow) y macrófagos (Ma). B) Folículo linfoide de pollo de 21 días de edad, en el que se muestra el incremento de tamaño de la región cortical. Los espacios que existen entre los tipos celulares representados están ocupados por linfocitos, en este caso se han omitido. (Tomada de Betti *et al.*, 1991).

Los linfoblastos se encuentran principalmente cerca del borde corticomedular. Varían en su tamaño, presentan un gran núcleo esférico con cromatina dispersa y un pequeño nucleolo. Presenta poco citoplasma que contiene polirribosomas, mitocondrias, algo de retículo endoplásmico y pequeñas vacuolas. Son negativos a la fosfatasa ácida y a la ANAE (Naukkarinen y Sorvari, 1984).

II 4. Ontogenia de la bursa de Fabricio

La bursa de Fabricio se desarrolla de un apéndice dorsal de la cloaca. Los esbozos de la bursa comienzan a formarse al cuarto día de incubación como una proliferación epitelial a lo largo del contacto ventral-caudal entre el rudimento cloacal y la superficie del epitelio ectodérmico. A partir del quinto día de vida embrionaria, surge un botón endodérmico rodeado por una cápsula de tejido mesenquimatoso. Al quinto o sexto día de incubación, se distingue una evaginación dorsocaudal de la cloaca.

Entre el sexto y octavo día de incubación el cordón epitelial desarrolla una luz central la cual se conecta al rudimento de la luz cloacal. La bursa se abre en su posición vertical y crece como un tallo cilíndrico. La primera plica epitelial se desarrolla entre el día noveno y décimo de incubación y se incrementan en número hasta llegar a ser 17 a 18 (Romppanen, 1982).

Hacia los 12 o 13 días del período embrionario del pollo, se observan varios botones epiteliales en las paredes replegadas de la cloaca que forman la bursa, lo que indica el inicio de la formación de los folículos linfoides (Paniagua y Nistal, 1983). Desde el día 13 hasta el 18 aproximadamente, se produce un desarrollo activo de los botones que conduce a la aparición de folículos incipientes.

La secuencia de los principales cambios morfológicos registrados durante la morfogénesis de los folículos linfoides de la bursa se describen a continuación y en la Figura 6 se resume la formación de los folículos linfoides (Oláh y Glick, 1992b).

1) Aparición y proliferación de células precursoras de linfocitos B en los botones y en la lámina subyacente. Se observan también células indiferenciadas, probablemente derivadas de la unidad formadora de colonias procedentes del saco vitelino, que se caracterizan por ser células basófilas y pironinófilas (ricas en ribosomas), las cuales podemos considerar linfoblastos (Paniagua y Nistal, 1983).

2) Formación de un retículo de células epiteliales en los botones, lo cual se debe a que las células epiteliales se alargan y desarrollan prolongaciones citoplásmicas que se interconectan para formar una red. Las células en contacto con la lámina basal tienen hemidesmosomas a ese nivel (Paniagua y Nistal, 1983).

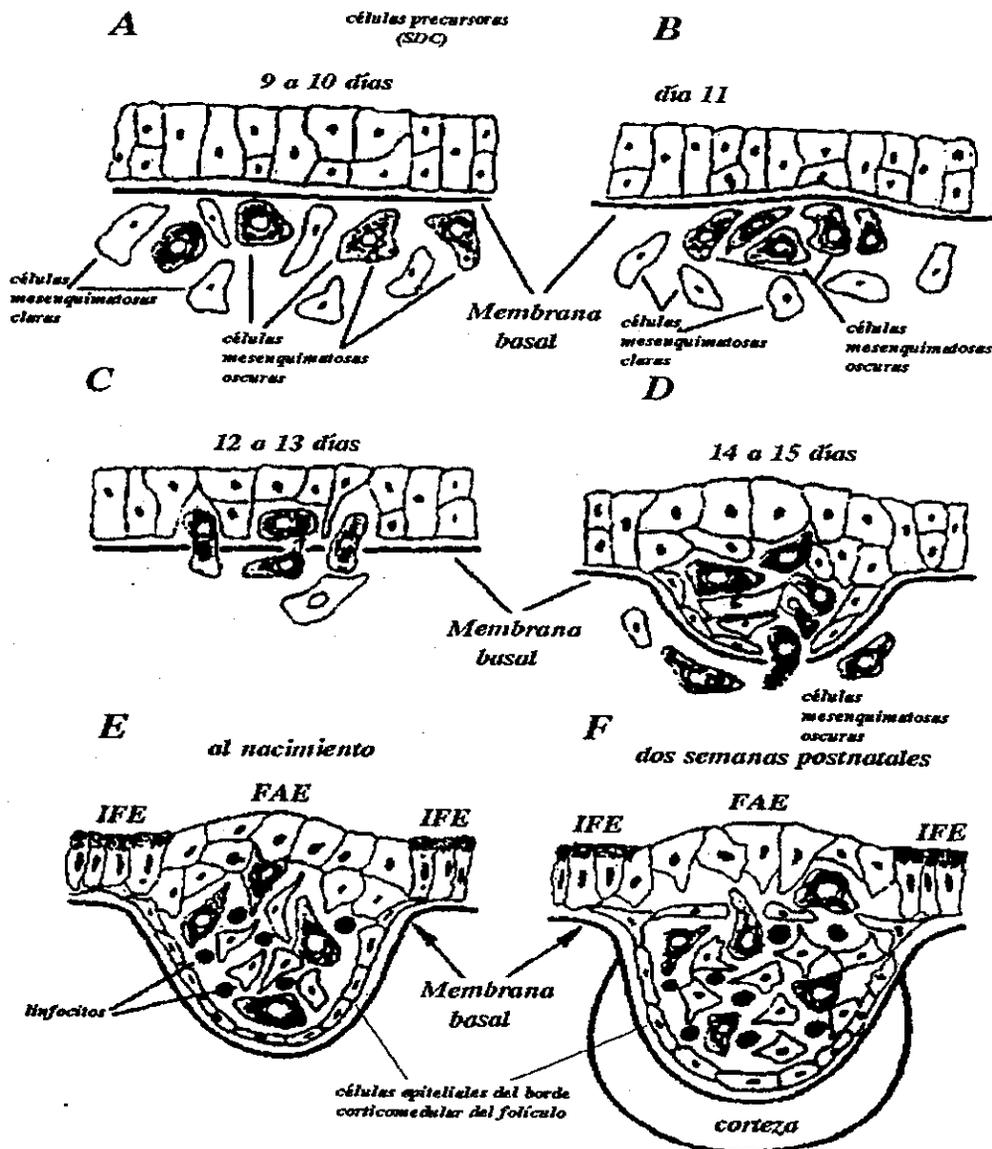


Figura 6. Esquema en el que se muestran los principales pasos de la diferenciación del foliculo linfoide y del epitelio de revestimiento. A) Células precursoras (células oscuras) de las células dendríticas secretoras (SDC) diferenciadas a partir del mesénquima bursal; B) Las células precursoras de las SDC se agrupan en una depresión debajo del epitelio de revestimiento; C) Las células precursoras de las SDC entran al epitelio a través de la membrana basal; D) Las células epiteliales proliferan formando un botón que es el precursor de la médula; E) La médula es sembrada completamente por las células B progenitoras (puntos oscuros); y F) La corteza de origen mesenquimatoso se organiza alrededor del botón, que posteriormente constituye la médula del foliculo. MB = membrana basal; IFE = epitelio interfolicular; FAE = epitelio asociado al foliculo. (Tomado de Oláh y Glick, 1992b).

3) Ruptura de la lámina basal del botón (hacia el día 15) que comienza a presentar discontinuidades con la aparición de los linfocitos. De este modo se permite la migración de los linfocitos de la lámina propia y se forma la corteza del folículo linfoide. El botón primitivo es ahora la médula (Paniagua y Nistal, 1983).

A partir del día 18 al 21 los folículos maduran y se organizan. Las zonas corticales y medulares ahora están bien definidas. La médula está constituida por una capa periférica limitante de células epiteliales, que rodea los linfoblastos y a los linfocitos (Paniagua y Nistal, 1983).

Del día octavo al día 15 de incubación, las células precursoras linfoides migran del mesénquima extrabursal al órgano en desarrollo y proliferan en los folículos bursales (Pink y Lassila, 1987). El número de células progenitoras B que colonizan inicialmente a los folículos es pequeño (menos de diez células por folículo) (Pink *et al.*, 1985). El desarrollo de invaginaciones de los dobleces epiteliales es visible primero como una hinchazón de la capa epitelial como a los 12 días de incubación (Houssaint *et al.*, 1976; Lassila *et al.*, 1979). Se forman alrededor de 10^4 folículos durante la colonización de la bursa por las células B progenitoras y este número permanece constante en las bursas maduras (Oláh y Glick, 1978b).

Las células progenitoras de las células B pueden ser detectadas en la región para-aórtica intraembrionaria entre los días tres o cuatro. Estos progenitores después migran al saco

vitelino entre los días cinco y seis, en donde comienzan a manifestar marcadores de superficie específicos de linfocitos B. Se muestran modificaciones en las porciones amino terminal de la cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas, para iniciar el rearreglo en los segmentos D y J_H. Las razones del rearreglo de los segmentos DJ_H puede deberse a: 1) el medio ambiente del saco vitelino; 2) a la remoción de un bloqueo de diferenciación de las células al migrar y salir del sitio intraembrionario. Las células progenitoras B que van con el rearreglo de los segmentos DJ_H colonizan varios órganos linfoides (Reynaud *et al.*, 1994).

Las células progenitoras B comienzan a rearreglar sus genes de las cadenas ligeras y pesadas, uno o dos días después, ya sea en la sangre o en el órgano linfoide. Este evento del rearreglo de los genes Ig es probablemente parte de un programa celular intrínseco, en vez de producirse en un sitio en particular. Una vez en el bazo o en la médula ósea las células progenitoras B cesan de dividirse y lentamente desaparecen (Figura 7) (Reynaud *et al.*, 1994).

En otros trabajos se evidencia que el rearreglo de los genes de la cadena ligera (L) de las inmunoglobulinas, que sufren las células progenitoras B en el tejido mesenquimatoso intraembrionario, se inicia en el día séptimo del desarrollo en los pollos, cuando aún éstas no han colonizado la bursa, por lo que se plantea que dicho rearreglo ocurre independientemente de la bursa de Fabricio (Mansikka *et al.*, 1990). La diversificación de la región variable se inicia después, cuando las células B expresan IgM de superficie durante la etapa de proliferación en los folículos linfoides de la bursa (Mansikka *et al.*,

1990). El principal mecanismo que genera la diversidad de las Igs en los pollos es por conversión génica observada en el día 15 del desarrollo embrionario (Mansikka *et al.*, 1990).

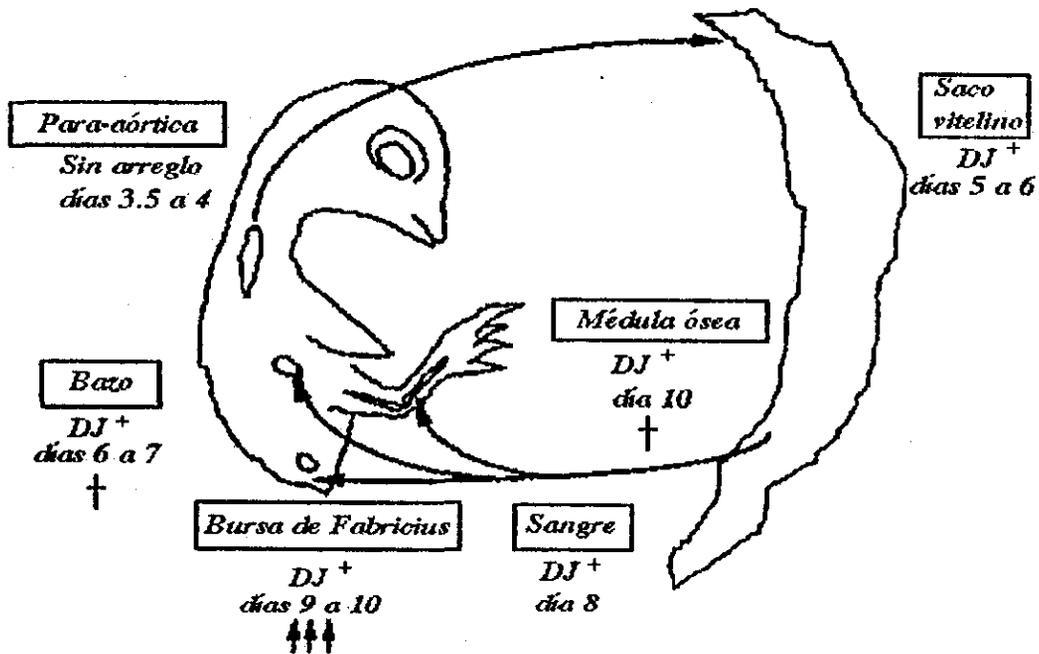


Figura 7. Esquema de la propuesta para la formación de las células progenitoras B en el embrión de pollo. Las células progenitoras se detectaban inicialmente dentro de la región para-aórtica del embrión, después migran al saco vitelino, donde las células progenitoras comienzan la segregación de las regiones DJ_H y colonizan varios órganos linfoides como el bazo, la médula ósea y la bursa vía circulación general. Solamente se desarrollan en la bursa (↑↑↑). El primer día en el que se detecta el rearreglo DJ_H está indicado para cada compartimento. (Reynaud *et al.*, 1994)

Las células progenitoras B colonizan la bursa a través de la vascularización general entre los días ocho al 14. Estas células alcanzan el epitelio bursal y junto con las células mesenquimatosas oscuras inducen la formación del folículo linfoide (Glick, 1993; Reynaud *et al.*, 1994). De dos a siete células progenitoras B colonizan cada folículo linfoide y posteriormente éste crece debido principalmente a la proliferación de las mismas. La

migración de las células progenitoras B al parecer está ligada con la expresión de ciertas moléculas en su superficie, como el carbohidrato X Lewis que es un ligando para selectinas de la familia de los receptores de adhesión vascular (Masteller *et al.*, 1995).

Diversos grupos han estudiado la migración de las células progenitoras B. Se ha propuesto que existe una segregación prebursal al demostrar, con la ayuda de anticuerpos monoclonales, que existen dos poblaciones celulares durante las primeras etapas del desarrollo de la bursa. Las células L22⁺ aparecen tempranamente durante el desarrollo embrionario en el saco vitelino, bursa, timo, bazo y médula ósea de manera simultánea (Houssaint *et al.*, 1987). Las células CL1⁺/L22⁺ representan linfocitos y un pequeño grupo de macrófagos, mientras que las CL1⁺/L22⁻ corresponden a la mayoría de los macrófagos y granulocitos, los cuales desaparecen al final de la vida embrionaria. Las células CL1⁺/L22⁻ y las CL1⁺/L22⁺ se observan primero fuera del rudimento bursal. Esto indica que existe una separación prebursal entre estos dos linajes hematopoyéticos y que las dos clases de precursores colonizan casi simultáneamente el rudimento bursal (día nueve para las CL1⁺/L22⁻ y día nueve a diez para las CL1⁺/L22⁺) (Houssaint, 1987). Según Houssaint (1987) la colonización del epitelio bursal por los precursores hematopoyéticos es un proceso de dos pasos.

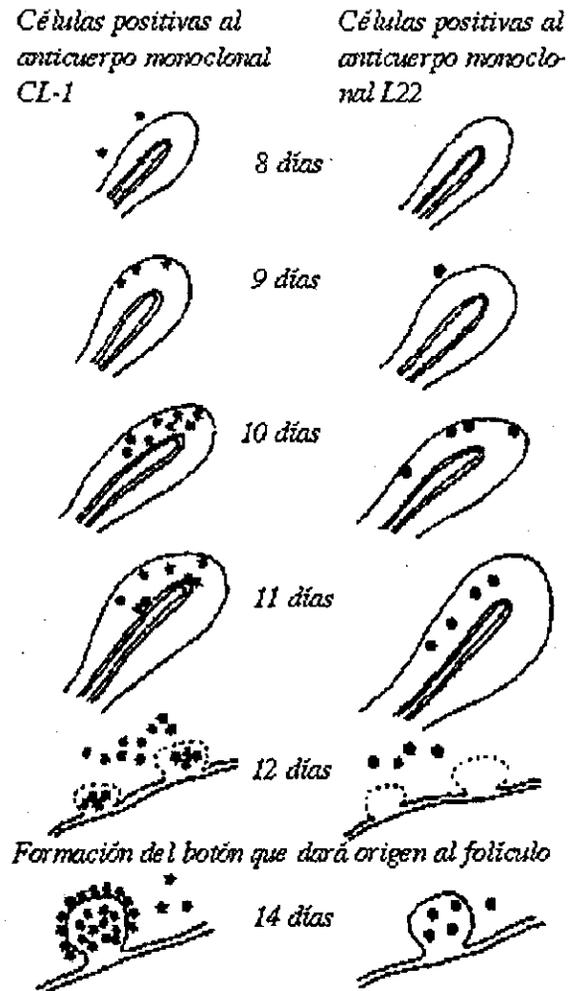


Figura 8. Esquema que muestra el estudio comparativo de las células teñidas con los anticuerpos monoclonales CL-1 o L22 durante el desarrollo embrionario de la bursa de Fabricio (Houissaint, 1987).

Las primeras células que entran pertenecen al linaje $CL1^+/L22^-$: Expresan antígenos semejantes a los Ia (esto se identificó con el anticuerpo monoclonal Tap 1 que identifica moléculas clase II del MHC); presentan morfología dendrítica y representan células del linaje de las células macrofágicas/dendríticas, responsables de la formación del botón epitelial que después es colonizado por un pequeño número de precursores linfoides del

linaje $CL1^+/L22^+$. El sembrado de las células ocurre primero en el mesénquima ricamente vascularizado, y hasta el día 10 los precursores hematopoyéticos se encuentran sólo en el mesénquima. Los precursores hematopoyéticos penetran en el epitelio comenzando en el primordio endodérmico bursal en su porción apical para después avanzar hacia la porción proximal final. Algunos de los precursores hematopoyéticos que colonizan la bursa no alcanzan el epitelio y vienen a comprometerse para diferenciarse por la ruta mieloide, principalmente, para el linaje granulocítico (Figura 8) (Houssaint 1987).

Se ha podido establecer que durante los días 12 y 15 de desarrollo embrionario, células positivas al antígeno de linfocitos maduros B (CBLA) y al antígeno asociado fetal (CFAA), este último es característico de células hematopoyéticas embrionarias, se localizaron predominantemente en la lámina propia muy cercanas a las células que contienen el antígeno para fibras reticulares (CBRFA). Esta asociación entre células $CBLA^+$, $CFAA^+$ y $CBRFA^+$ determina los estadios tempranos de la diferenciación de las células B e insinúa el arreglo de la corteza folicular en la bursa del pollo adulto (Boyd y Ward, 1984). También durante el desarrollo embrionario y después del nacimiento se ha demostrado la síntesis de cadenas J en estadios tempranos de la diferenciación de los linfocitos B en la bursa, lo que coincide con la maduración de los linfocitos B y puede también estar correlacionado con la síntesis de IgM (Moriya, 1995).

La médula de los folículos se forma durante la vida embrionaria y la corteza folicular se desarrolla poco antes del nacimiento. Las células precursoras comienzan a expresar

antígenos de superficie característicos de células B, conforme se da la diferenciación de la bursa. Células que expresan moléculas clase II del MHC (B-L⁺ semejantes a células Ia⁺) se hacen evidentes al día diez de incubación y al día 12 se detectan células IgM⁺ (Hoshi *et al.*, 1988).

Aunque la población principal de la bursa está representada por los linfocitos B, los cuales se diferencian en los folículos epiteliales, la diferenciación de células mieloides también tiene lugar en este órgano. Durante la vida embrionaria en la bursa ocurre una actividad de granulopoyesis restringida a los componentes mesenquimatosos que desaparece al nacimiento. También se ha descrito una eritropoyesis discreta en el mesénquima de la bursa durante la vida embrionaria (Zapata y Cooper, 1990).

Resumiendo, la histogénesis de la bursa de Fabricio es el resultado de la evolución coordinada de varios eventos en los cuales tres elementos tisulares participan activamente: El epitelio de origen endodérmico, el mesénquima y las células hematopoyéticas que migran y se instalan en la bursa durante la vida embrionaria; las evidencias experimentales han demostrado que la participación del micro ambiente es crucial para el inicio de la diferenciación de las células B (Glick, 1977; Eerola *et al.*, 1982; Oláh y Glick, 1987; Glick y Oláh 1993a; Glick y Oláh 1993b; Glick 1995) Como se señala anteriormente, las interacciones tisulares entre la capa endodermal y la mesodérmica son decisivas para la histogénesis de la bursa (Le Douarin *et al.*, 1980, Houssaint *et al.*, 1986).

II 5. Involución de la Bursa de Fabricio.

El peso de la bursa se incrementa con la edad y alcanza su peso máximo entre las 10 a 15 semanas; posteriormente decrece y se originan quistes, principalmente en la médula folicular, comenzando en la semana 19 (Naukkarinen y Sorvari, 1984).

La bursa tiene un crecimiento marcado durante el desarrollo embrionario. Después del nacimiento se han identificado tres fases de crecimiento: 1. Fase rápida, desde el nacimiento hasta las tres o cuatro semanas de edad, período durante el cual incrementa su peso hasta alcanzar un máximo entre las 10 y 15 semanas. Esto indica el inicio de la fase: 2 o fase de meseta. La fase 3 se conoce como fase de regresión y ocurre después de las 19 semanas de edad, caracterizada por la formación de quistes, principalmente en la médula folicular (Frazier, 1974; Glick, 1984; Paniagua y Nistal, 1983). Las edades en las que se pueden presentar estas fases de crecimiento en la bursa varían de acuerdo a la raza de los pollos (Glick, 1984).

Los cambios histológicos experimentados por la bursa de Fabricio durante su regresión consisten en una pérdida de peso después de las 12 semanas, debido a una involución histológica que ocurre entre los 10 y 23.5 semanas, dependiendo de la raza de los pollos, (Glick, 1984) y que consiste en un plegamiento del epitelio interfolicular. Al mismo tiempo, la bursa comienza a sufrir una involución mucoide lo que conduce a la sustitución del tejido linfóide por tejido fibroso, la cual se incrementa en la región subepitelial (Zapata y Cooper, 1990).

Decrece significativamente el número de mitosis por folículo entre la semana 10 a 16 y la capacidad endocítica se va perdiendo y prácticamente desaparece alrededor de la semana 19 (Zapata y Cooper, 1990). Alrededor de los seis meses, la bursa parece un residuo fibroso desprovisto de luz y de estructuras linfoepiteliales.

Se ha establecido que la involución de la bursa ocurre al darse la madurez sexual. Esta involución coincide además con un incremento en el tamaño de las glándulas adrenales (Glick, 1984). Lo anterior haque se ha sugerido que la involución de la bursa de Fabricio está relacionada con el incremento en la producción de esteroides gonadales o adrenales durante el advenimiento de la pubertad (Glick, 1984; Ylikomi *et al.*, 1987a; 1987b; Ylikomi y Tuohimaa, 1989; Byrd *et al.*, 1994). Por otro lado, la administración de esteroides en etapas prepuberales induce la regresión de la bursa (Glick *et al.*, 1956; Meyer *et al.*, 1959), y la administración de estradiol, en dichas etapas induce la aparición de receptores a progesterona en la bursa (Ylikomi y Tuohimaa, 1989)

II 6. Función de la bursa de Fabricio

Se sabe que la bursa de Fabricio de las aves es el órgano central involucrado en promover la diversidad inmunológica durante el desarrollo embrionario y durante las primeras etapas postnatales, ya que está involucrada en la formación y maduración de los linfocitos B, en la síntesis de anticuerpos, y en la liberación de factores humorales que inciden sobre las células linfoides (Farner y King, 1973, Gilmour y Bridges, 1977, Blythman y White, 1977).

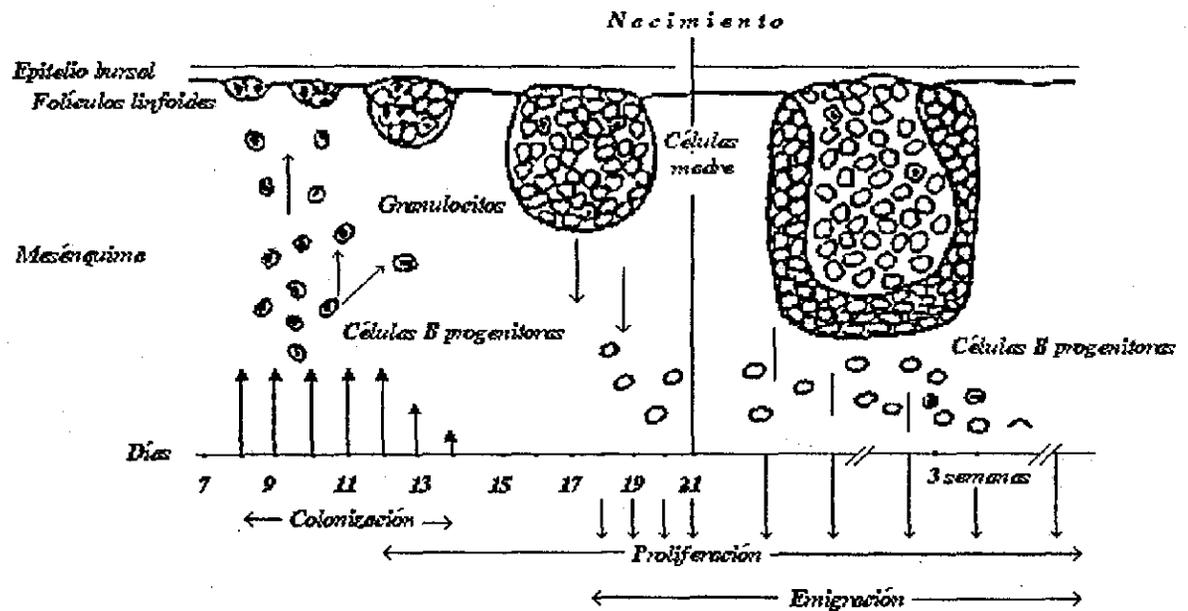


Figura 9. Representación esquemática de la colonización de las células B progenitoras, su proliferación y emigración como linfocitos B, durante la morfogénesis del folículo linfoide. (Tomado de Weill y Reynaud, 1987).

La principal función de la bursa es proveer un micro ambiente adecuado donde se den rápidamente las divisiones celulares, permitiendo así, la generación de la diversidad inmunológica a través del rearrreglo y diversificación somática de los genes Ig de los pollos (Figura 9) (Weill, *et al.*, 1987; Zapata y Cooper, 1990; McCormack y Thompson, 1990; McComarck *et al.*, 1991). Varios grupos de investigadores han expresado la importancia que tiene la creación de un ambiente adecuado durante la histogénesis de la bursa (Glick, 1977; Oláh y Glick, 1987; Glick y Oláh, 1993a; 1993b; Glick, 1995; Bläuer y Tuohimaa, 1995).

La presencia de los componentes epiteliales y linfoides en la bursa de Fabricio son necesarios para el desarrollo de los linfocitos B (McCormack *et al.*, 1991) debido a que la interacción de estos componentes provee la creación de un micro ambiente adecuado. Esto se ha comprobado experimentalmente al extraer quirúrgicamente, en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, la región epitelial que dará origen a la bursa, o cuando se bursectomiza en etapas del desarrollo embrionario avanzadas.

Al intervenir quirúrgicamente a los embriones de pollo antes de que aparezca el primordio de la bursa, se ha visto que los animales que carecen de bursa, no son capaces de generar anticuerpos específicos ante un antígeno pero sí producen inmunoglobulinas citoplásmicas, superficiales y séricas del tipo IgM, IgG e IgA (Jalkanen *et al.*, 1983; Ratcliffe, 1985). En contraste, cuando a los pollos a los 17 días de desarrollo embrionario se les bursectomiza, se provoca que las aves tengan una inmunodeficiencia profunda (Reynaud *et al.*, 1994).

El tratamiento con testosterona entre los días sexto a octavo de la embriogénesis del pollo inhibe el crecimiento de la bursa de Fabricio al provocar la ausencia de los componentes epiteliales, originándose una inmunodeficiencia profunda, a pesar de que estas aves tratadas con testosterona desarrollan números adecuados o similares de células Ig y los niveles de Ig⁺ circulantes son normales a los seis meses de edad; sin embargo, estos organismos son incapaces de tener una respuesta inmunológica primaria o secundaria (Weill *et al.*, 1987, McCormack y Thompson, 1990).

La bursectomía neonatal no tiene los efectos anteriores debido a la distribución de las células B en otros órganos antes del nacimiento. (Ratcliffe, 1985).

Otra sustancia que depleta específicamente a los linfocitos del folículo de la bursa es la ciclofosfamida aplicada entre los 15 y 17 días de desarrollo embrionario. Provoca la ausencia de células B positivas en su superficie a la Ig y una reducción en la cantidad de Ig circulante (McCormack y Thompson, 1990; McCormack *et al.*, 1991). Sin embargo, si la porción epitelial permanece intacta después del tratamiento con la ciclofosfamida se pueden reconstituir los compartimentos linfoides en los folículos vacíos (Ratcliffe, 1985). Al introducir precursores de las células B de una bursa normal en estos organismos tratados con ciclofosfamida y repoblar la bursa deficiente de células B y restablecer la inmunidad humoral. Estas células progenitoras de las células B son células IgM⁺ de superficie y están presentes entre el día 15 y el nacimiento pero se pierden rápidamente en el período postnatal (Pink y Lassila, 1987; McCormack y Thompson, 1990; McCormack *et al.*, 1991). De hecho estudios realizados por Eerola y colaboradores (1982) demuestran que la interacción de las células precursoras B con los elementos epiteliales es de gran importancia y requiere de un micro ambiente bursal (Ratcliffe, 1985).

El epitelio bursal parece proveer un estímulo que puede inducir la aparición de los antígenos MHC clase II sobre los linfocitos. Además la bursopoietina, derivada del tejido bursal puede inducir la expresión de los antígenos Bu-1 de las células B.

Otro hallazgo importante que apoya la necesidad del micro ambiente proporcionado por la bursa es el hecho de que en los pollos bursectomizados la IgG sérica muestra la cadena- γ

pesada normal pero se alteran las cadenas ligeras, con puntos isoeléctricos más básicos y menos diversos que las normales. Estas cadenas ligeras pueden ser la manifestación de especificidades de la línea germinal sin diversificación por mutaciones somáticas. Estos resultados plantean por lo tanto que la bursa de Fabricio al parecer no es necesaria para la formación de inmunoglobulinas como tal, pero su participación en la creación de un amplio repertorio de anticuerpos probablemente esté mediado por el micro ambiente del folículo linfoide, al promover las mutaciones somáticas requeridas para la diversificación de los anticuerpos (Jalkanen *et al.*, 1983).

Las evidencias experimentales apuntan a que la bursa no es necesaria para el rearreglo de los genes de las inmunoglobulinas y la diferenciación de los linfocitos B, pero si influye en el desarrollo de la diversidad inmunogénica (McCormack *et al.*, 1991).

La tasa de proliferación de los linfocitos en la bursa varía dependiendo de la etapa de desarrollo; En el embrión de pollo es 6.4 por ciento por hora, en el estado neonatal se incrementa a 10.0 por ciento por hora y decrece a un 6.4 por ciento por hora a las seis semanas después del nacimiento (Ekino, 1993). Se ha especulado que la proliferación que se da en los linfocitos B de la bursa en el estado neonatal (Ekino *et al.*, 1979) está vinculada con la presencia de antígenos ambientales conducidos hasta la médula del folículo por las células FAE. Ciertos experimentos en los que se ha ligado el conducto bursal (BDL), que comunica la bursa con el intestino, demuestran una disminución de hasta 60 por ciento en el peso de la bursa y un decremento de la densidad celular en la médula del

fóliculo linfoide y folículos bursales pequeños en los pollos BDL y una reducción en la diversificación de las células B (Ekino, 1993; Reynaud *et al.*, 1994).

A pesar de la tasa de proliferación elevada por parte de los linfocitos en la bursa de Fabricio, sólo entre el uno al cinco por ciento de las células producidas por día sobreviven y al parecer el resto muere *in situ* (Motyka y Reynolds, 1991). En las placas de Peyer de borregos, la apoptosis de los linfocitos B se ha interpretado como un mecanismo por medio del cual se determina el repertorio de las células B (Motyka *et al.*, 1995). Existe la evidencia experimental de que *in vitro* la sobrevivencia celular en la bursa de Fabricio de embriones de pollo aumenta al añadir el factor de crecimiento neuronal (NGF) (Bracci-Laudiero *et al.*, 1993).

Hay controversia en cuanto a la diferenciación y maduración de los linfocitos B, ya que se ha planteado que ambos procesos ocurren sin la participación de un estímulo antigénico (Bockman y Cooper, 1973; Lydyard *et al.*, 1976; Moriya y Ichikawa, 1979; Dolfi *et al.*, 1989). Y por el contrario, que la estimulación antigénica juega un papel importante en el desarrollo de los linfocitos B, o por lo menos, influyendo en la amplificación de las poblaciones de linfocitos en el desarrollo normal de la bursa (Sorvari y Sorvari, 1977; Ekino *et al.*, 1985; Ekino, 1993; Ekino *et al.*, 1995). Esta pregunta que se plantea para la bursa, también se ha hecho para las placas de Peyer encontrándose que al mantener libre de gérmenes el intestino o aislado a través de ligar algunos segmentos, la diversificación de la Ig no cambia, sin embargo la proliferación celular se deteriora después de varias semanas sin tener contacto con antígenos externos (Reynaud *et al.*, 1994)

La administración de *E. coli* en organismos de cuatro semanas de edad u otros antígenos en la luz de la bursa induce la producción de "anticuerpos naturales "séricos" y la amplificación específica de una respuesta inmunológica primaria en el bazo (Ekino *et al.*, 1979; Ekino *et al.*, 1985).

Estos resultados sugieren que los antígenos ambientales juegan un papel importante en la proliferación de células B y en la diferenciación en la bursa neonatal (Ekino *et al.*, 1985).

Sin embargo, diferentes grupos plantean que la conversión génica que sufren las células B durante su proliferación puede contribuir a la expansión del repertorio preinmunológico siendo independiente de antígenos (Weill *et al.*, 1987; Reynaud *et al.*, 1994). Incluso se plantea que la diferenciación de los linfocitos B de los pollos es un proceso independiente de la bursa y que puede llevarse a cabo en un pozo hematopoyético intraembrionario, como en mamíferos (Mansikka *et al.*, 1990). A pesar de ello el micro ambiente generado por los elementos foliculares podría participar en la diversificación de las inmunoglobulinas por la activación de la conversión génica (Mansikka *et al.*, 1990). Sin embargo, existen posiciones diferentes en las que se plantea que la producción de anticuerpos es inducida por antígenos y es parte de un mecanismo de protección local (Schaffner *et al.*, 1974) que además proporciona un estímulo antigénico que puede acelerar la expansión de proliferación de las células B de una manera antígeno específica en la bursa (Sorvari *et al.*, 1975).

Es bien conocido que la diferenciación de las células progenitoras de la bursa y el sembrado de células B de la bursa a tejidos linfoides periféricos ocurre durante las primeras semanas después del nacimiento (Cooper *et al.*, 1969; Toivanen y Toivanen, 1973). Esto ha permitido que Ekino (1993) y otros investigadores propongan que la preparación neonatal vía la ruta bursal es el medio más efectivo para la proliferación de los linfocitos, la diferenciación de precursores de células formadoras de anticuerpos y la inducción de “anticuerpos naturales séricos” contra bacterias o heteroeritrocitos. A su vez, se resalta la importancia de los antígenos ambientales en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en la bursa neonatal (Sorvari y Sorvari, 1977; Ekino *et al.*, 1985).

El aislamiento de la bursa del intestino al ligar el conducto bursal antes del nacimiento suprime el desarrollo de células IgG⁺ en la bursa después del nacimiento. Además la administración de antígenos en la luz de la bursa previamente a la ligadura del conducto provoca un incremento significativo de células IgG⁺ en la bursa comparadas con las bursas aisladas del intestino por la ligadura (Ekino *et al.*, 1995).

La bursa también ha sido considerada por algunos autores como un órgano linfoide secundario debido a que después del nacimiento participa en la producción de anticuerpos (Sorvari *et al.*, 1975; Naukkarinen y Sorvari, 1984; Zapata y Cooper, 1990; Ekino, 1993; De Azevedo y Betti, 1993).

Existen algunos trabajos en los que de manera puntual destacan la participación de algunas moléculas como las inhibinas y activinas que son sustancias reconocidas como miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β y de diferenciación, las que participan de manera importante en la regulación de procesos reproductivos y del desarrollo embrionario. Las subunidades α , β_A , y β_B de las inhibinas/activinas, se han demostrado en el epitelio bursal, desde los 11 días de desarrollo embrionario hasta las 22 semanas después del nacimiento (Bläuer y Tuohimaa, 1995). La máxima intensidad de reacción se ha visto en el día 18 de desarrollo embrionario y hasta una semana después del nacimiento. La subunidad α de la inhibina no fue detectada, lo notorio fue también la presencia de la activina -A ($\beta_A \beta_B$ homodímeros) en la región medular y la activina-B ($\beta_B \beta_B$ homodímeros) en la región de las células FAE. Estos resultados sugieren que probablemente la localización diferencial de estas moléculas participe activamente en la creación del micro ambiente requerido para la maduración de los linfocitos B (Bläuer y Tuohimaa, 1995). Las células B maduras expresan β -1 integrinas, moléculas que median la unión de las células a varias moléculas de la matriz extracelular, como colágenas, laminina, fibronectina y vitronectina. Sin embargo el bloqueo del epítipo de las β -1 integrinas no inhibe la colonización de la bursa, a pesar de que la unión de las células B a las células del estroma esta mediada por las β -1 integrinas (Palojoki *et al.*, 1993).

Se ha sugerido una relación de la bursa con la respuesta de las células T, sobre todo con poblaciones de linfocitos T supresores, debido a que en pollos bursectomizados se ha visto una carencia de esta población celular (Moticka, 1977). Sin embargo, existen también evidencias que no apoyan estas propuestas y que sugieren que la bursa de Fabricio no es

necesaria para el desarrollo de la respuesta inmunológica dependiente del timo, ya que en los pollos bursectomizados, y tratados con ciclofosfamida, no se han encontrado diferencias morfológicas en el timo (Jankovic *et al.*, 1976; Jankovic *et al.*, 1977; Jalkanen *et al.*, 1983)

En cuanto a las sustancias liberadas por la bursa de Fabricio se ha descrito una sustancia denominada bursopoiatina o bursina, la cual es considerada una hormona tripeptídica que induce la diferenciación temprana de las células B, promoviendo la aparición de los antígenos de superficie (Bu-1) (Eerola *et al.*, 1982; Bläuer y Tuohimaa, 1995).

Se ha propuesto también que la bursa tenga una participación como órgano endocrino, debido a la influencia de la bursa en la función de la glándula adrenal y las gónadas, además de proponerse que el sistema inmune humoral pueda afectar negativamente al eje hipotálamo-hipófisis-gónada del neonato (Glick, 1977; Glick, 1980; Glick, 1984; Byrd *et al.*, 1993).

Se ha visto que la bursa sintetiza también un péptido denominado, péptido anti-esteroidogénico bursal (BASP) que inhibe la biosíntesis de progesterona por las células de la granulosa de folículos preovulatorios de ave, estimuladas con hormona luteinizante (LH) y que modula la esteroidogénesis *in vitro* de las células adrenales de aves, cerdos y perros, incluso en poblaciones celulares estimuladas con hormona adrenocorticotrópica (ACTH) suprimiendo la producción de cortisol en células normales y de células adrenocorticales derivadas de tumores (Byrd *et al.*, 1993; Byrd *et al.*, 1994; Byrd *et al.*, 1995). En las

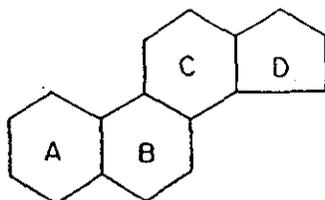
investigaciones encaminadas a ubicar el sitio en el cual el BASP inhibe la ruta esteroidogénica en las células de la granulosa del ovario de pollos, se determinó que puede limitar la disponibilidad de precursores de progesterona al inhibir la actividad del complejo multienzimático que cataliza la eliminación de los seis carbonos del colesterol (Byrd y Hargis, 1995).

La estructura histológica de la bursa se puede alterar por la administración intramuscular de prolactina ovina, la cual estimula la actividad mitótica del epitelio superficial, la corteza y la médula de la bursa (Glick, 1984).

II 7. Biosíntesis de hormonas esteroideas

La estructura común de todas las hormonas esteroideas es la del núcleo esteroide. Este es un hidrocarburo cíclico constituido por 17 átomos de carbono, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono totalmente saturados (perhidrofenantreno) que se denominan A, B y C, y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano), que corresponde al anillo D. Pueden agregarse carbonos adicionales en las posiciones 10 y 13 o como una cadena lateral, unida al carbono 17 (Figura 10) (Granner, 1992).

Tanto las hormonas esteroideas, como sus precursores y metabolitos, difieren en el número y tipo de grupos sustituibles, en el número y localización de las dobles ligaduras y en la configuración estereoquímica (Norris, 1985; Lantos y Gros, 1985).



Núcleo del
ciclopentano
perhidrofenantreno

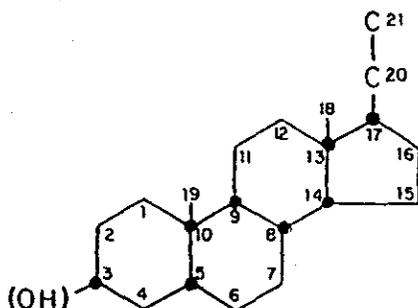


Figura 10. Esquema que muestra las características estructurales de las hormonas esteroideas. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno, núcleo básico de las hormonas esteroideas, constituido por 17 carbonos que forman cuatro anillos designados de la A a la D. Se señalan las posiciones de los carbonos asimétricos (Tomado de Knobil y Neill, 1994).

Los carbonos asimétricos, permiten el estereoisomerismo. Los grupos metilo angulares (C₁₉ y C₁₈) en las posiciones 10 y 13, se proyectan hacia el frente del sistema de anillos y se utilizan como punto de referencia. Cuando los sustituyentes están situados por encima del plano, se dice que están orientados en beta (β) y se indican con un trazo continuo. Por lo

contrario, si se proyectan por debajo del plano, se dice que están orientados en alfa (α) y se representan con trazo discontinuo (Figura 11) (Norris, 1985; Lantos y Gros 1985).

El átomo de hidrógeno unido al C5 también puede estar orientado en α o β . En el primer caso, los anillos se fusionan en una conformación *trans* mientras que la orientación β origina una conformación *cis* (Figura 11) (Norris, 1985; Lantos y Gros, 1985).

La posición de los dobles enlaces se designa mediante el número del carbono que los antecede, por ejemplo Δ^5 y Δ^4 (Norris, 1985; Lantos y Gros, 1985).

La síntesis de las hormonas esteroideas se inicia a partir del colesterol, un esteroide C_{27} . El colesterol es sintetizado del acetato (acetilcoenzima A) producido por la vía de la glucólisis o vía de la oxidación de ácidos grasos (Figura 12). La síntesis del núcleo esteroideo es a partir de las unidades de acetato, y se denomina esteroidogénesis e involucra una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. La mayor parte del colesterol se sintetiza en el hígado y se libera al torrente sanguíneo como gotitas de lípidos cubiertas con una proteína transportadora de andrógenos. La corteza adrenal, los ovarios y el testículo pueden utilizar este complejo lipoproteico como fuente de colesterol (Norris, 1985).

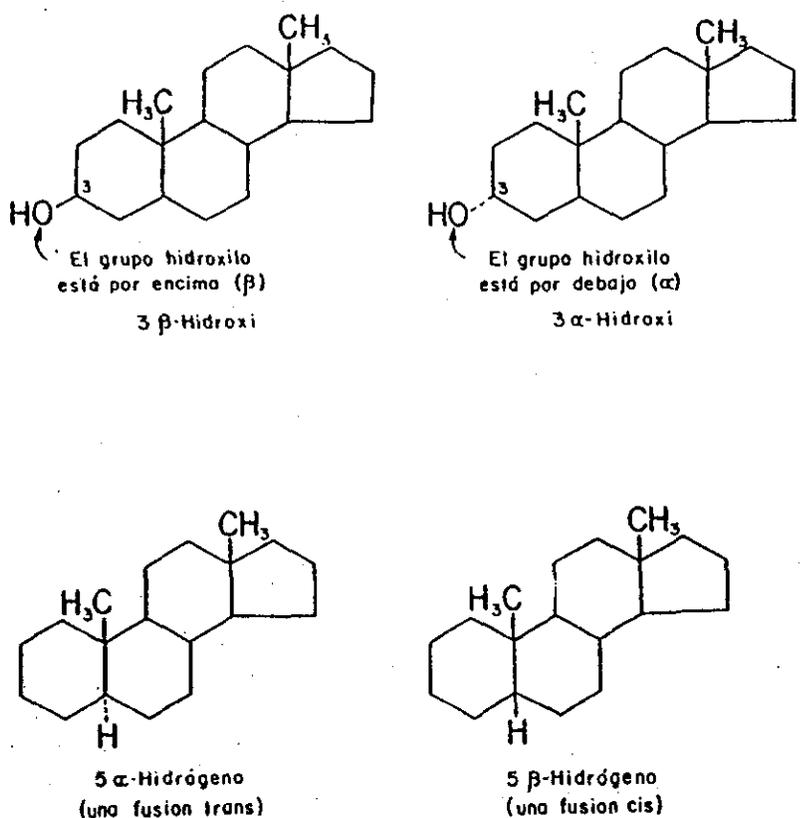


Figura 11. Esteroisomería de los carbonos tres y cinco en el ciclopentanoperhidrofenantreno. A) Sustituyente situado por encima del plano β o proyectado por debajo del plano α . B) Si el átomo de hidrógeno del C5 se encuentra orientado en α , los anillos A y B se fusionan en una orientación *trans*; mientras que si está orientado en β , origina una configuración *cis* (Tomado de Knobil y Neill, 1994).

Las hormonas esteroides tienen como máximo 21 átomos de carbono, mientras que el colesterol tiene 27 por lo que el primer paso en la biosíntesis de estas hormonas es la ruptura del enlace covalente entre las C_{22} y C_{20} , por medio de tres monooxigenaciones sucesivas, con la consecuente formación de pregnenolona compuesta de 21 átomos de carbono y un fragmento de seis átomos de carbono, el aldehído isocaproico (Figura 12).

El complejo multienzimático que cataliza esta reacción se localiza en la cara interior de la membrana interna mitocondrial y consta de tres componentes: El citocromo P450 scc (*side-chain cleavage*), que es una oxigenasa terminal (aceptora de electrones), una flavoproteína dependiente de NADPH y la ferrosulfoproteína luteoxina, que sirve para transportar un electrón entre los otros dos componentes. Este sistema enzimático requiere de NADPH, oxígeno y colesterol para que se pueda llevar a cabo la reacción (Figura 12) (Norris, 1985; Lantos y Gros, 1985).

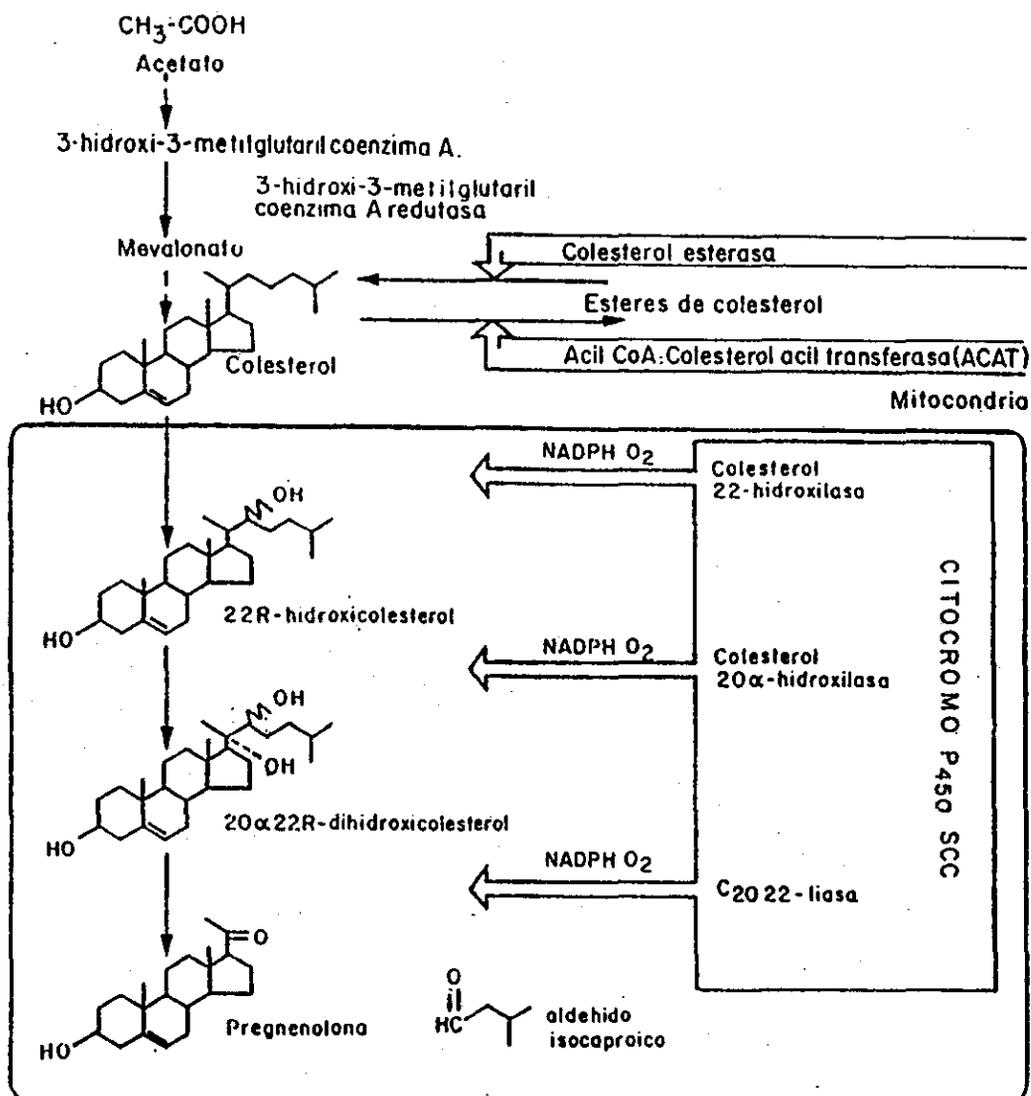


Figura 12. Vía de síntesis de la pregnenolona a partir del colesterol sintetizado *de novo* o derivado de fuentes existentes. Se ilustra el mecanismo de ruptura de la cadena lateral del colesterol, por medio de tres monooxigenaciones sucesivas, catalizadas por el complejo multienzimático del citocromo P450scc localizado en la mitocondria (Tomado de Knobil y Neill, 1994).

La conversión de la pregnenolona en progesterona se efectúa mediante una reacción catalizada por la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), cuya actividad se localiza en la fracción microsomal. Este complejo enzimático presenta dos actividades catalíticas principales (deshidrogenasa e isomerasa) que, en conjunto, son las responsables de la transformación de los esteroides 3 β -hidroxi-5-ene en 3-oxo-4-ene. Además, utiliza NAD⁺ como aceptor de electrones y la reacción es esencialmente irreversible en condiciones fisiológicas (Figura 13).

Los tejidos endocrinos que sintetizan andrógenos, utilizan tanto a la pregnenolona y a la progesterona como precursores para la formación de androstenediona y testosterona, que son los andrógenos más importantes. La escisión de la cadena lateral de los esteroides C₂₁, es el paso limitante de la velocidad de síntesis de los andrógenos (C₁₉). Este proceso bioquímico está catalizado por el complejo enzimático 17 α -hidroxilasa/C17-C20 liasa que contiene citocromo P-450_{C17}; requiere NADPH y oxígeno molecular para su función y se localiza en las membranas del retículo endoplásmico liso. La hidroxilación del carbono 17 de la pregnenolona o de la progesterona es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral y la 17 α -hidroxilasa lo cataliza, dando lugar a la formación de 17 α -hidroxipregnenolona o 17 α -hidroxiprogesteroa, respectivamente. La ruptura de la unión entre los átomos de carbono 17 y 20 se efectúa posteriormente por la acción de la C17-C20 liasa (Figura 13).

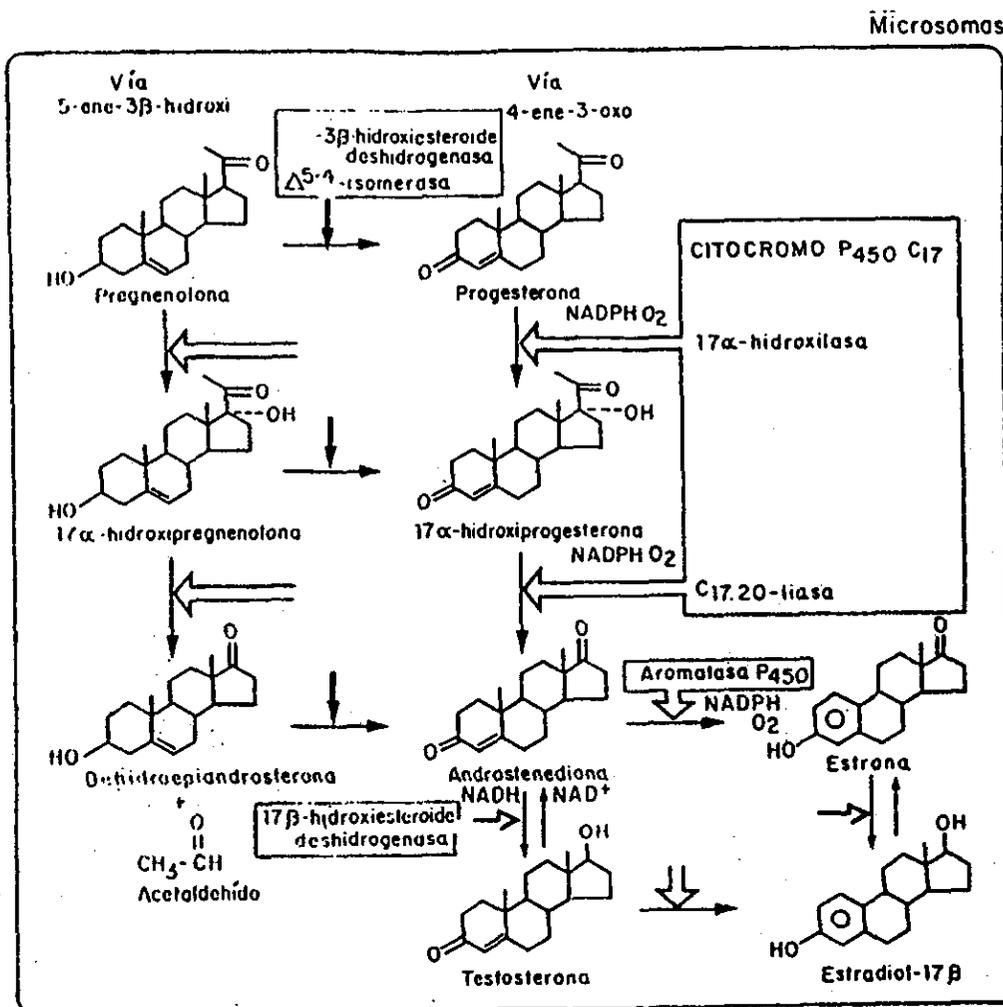


Figura 13. Metabolismo de la pregnenolona para la formación final de estrógenos (C₁₈). Se representan los diferentes complejos enzimáticos involucrados, los intermediarios y las vías alternativas Δ^4 y Δ^5 para la síntesis de estrógenos en el ovario (Tomada de Knobil y Neill, 1994).

Una vez formada la pregnenolona (P₅), puede entrar a alguna de las vías esteroidogénicas básicas: la vía Δ^5 o de la pregnenolona por ejemplo, que forma dehidroepiandrosterona (DHEA o 5-androsteno-3 β -ol-17ona) a partir de P₅, o bien la misma pregnenolona

transformarse a progesterona (P_4) y entrar a la vía Δ^4 , que forma androstenediona a partir de P_4 (Norris, 1985; Lantos y Gros, 1985).

La biosíntesis de andrógenos se puede efectuar por dos vías alternativas; la vía Δ^5 cuando el sustrato que se utiliza es la pregnenolona o la vía de los Δ^4 en el caso de que la progesterona se utilice como precursor. Los productos resultantes serán la dehidroepiandrosterona o la androstenediona respectivamente. El predominio de una de estas vías depende de la especie (Figura 14).

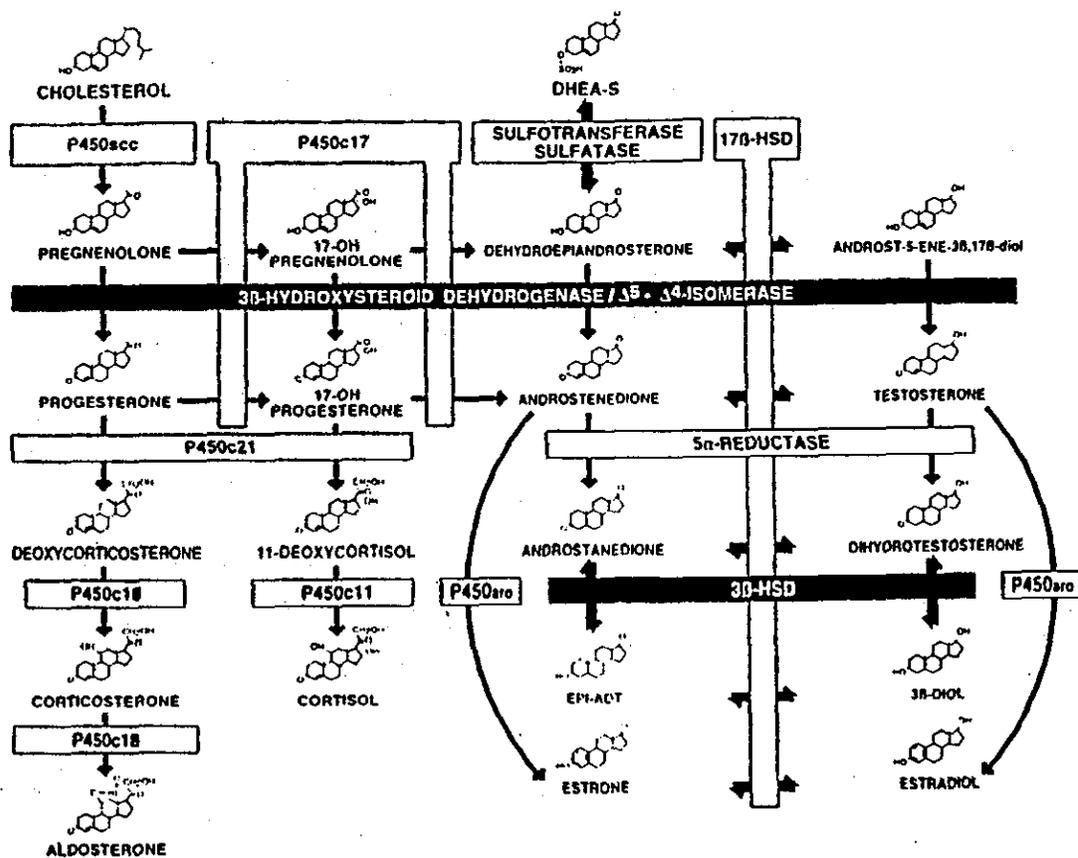


Figura 14. Representación esquemática de las principales rutas esteroidogénicas en mamíferos (Tomada de Simard *et al.*, 1996).

II 8. Relación de la bursa de Fabricio con las hormonas esteroides.

La bursa es un órgano blanco de las hormonas esteroides que secretan las glándulas suprarrenales, los ovarios y el testículo. Estas hormonas pueden afectar el desarrollo de la función inmunológica (Glick, 1984; Meyer *et al.*, 1959, Dieter y Breitenbach, 1970, Norton y Wira, 1977).

A nivel fisiológico los glucocorticoides pueden actuar como inmunosupresores involucrados en el control de la respuesta inflamatoria y de la respuesta inmunológica. Se ha demostrado que *in vitro* e *in vivo* la dexametasona afecta la viabilidad de las células dendríticas secretoras, su capacidad de expresar moléculas de clase II del MHC, y de presentar antígenos, alterando por lo tanto, la función de activación de los linfocitos T (Moser *et al.*, 1995).

Se ha visto también la influencia de hormonas adrenocorticales en la densidad y la citología del tejido linfático (Glick, 1984; Santisteban, 1960). Existen pruebas en las que se demuestra que los andrógenos, específicamente la 19-nortestosterona o el propionato de testosterona inhiben parcial o completamente el desarrollo de la bursa. El propionato de testosterona induce una regresión o inhibición de la bursa en el embrión de pollo, manifestada por una pérdida en el peso de la bursa y cambios en la estructura histológica de los folículos linfoides, en los que aumenta de manera notable el tejido conjuntivo y se da la formación de quistes. Estos experimentos sugieren que la administración de testosterona podría tener un efecto de carácter irreversible sobre el desarrollo de la bursa (Szenberg,

1976; Gasc y Stumpf, 1981, Lupetti *et al.*, 1983). De hecho, las dosis altas de testosterona bloquean de manera irreversible el desarrollo de los precursores que participan en la formación del botón que dará origen al folículo linfoide (Le Douarin *et al.*, 1980).

La administración de diferentes tipos de esteroides que tienen propiedades androgénicas, anabólicas, progestacionales, estrogénicas o de glucocorticoides durante el desarrollo embrionario del pollo muestran un efecto negativo sobre el desarrollo de la bursa de Fabricio provocando una reducción en el peso de ésta, modificaciones en su histomorfología y, consecuentemente, alteraciones sobre su función, así como de los órganos linfoides dependientes de la bursa para la expresión de la respuesta humoral, no importando el tipo de esteroide del que se trate (Glick, 1984; Verheul *et al.*, 1986).

Por otro lado, también se ha propuesto un efecto modulador de este órgano linfoide sobre las glándulas esteroideogénicas (Besedovsky y Sorkin, 1977; Glick, 1984). La ausencia de la bursa produce cambios en el desarrollo de las glándulas adrenales y el testículo. La bursectomía *in ovo* a las 68 horas provoca una hipertrofia del testículo y un aumento en la frecuencia de las células de Leydig maduras en el día 17.5 del desarrollo embrionario. Estos testículos hipertróficos producen más testosterona que los controles *in vitro* (Pedernera *et al.*, 1980a; Pedernera *et al.*, 1980b; Aguilar *et al.*, 1981; Glick, 1984). Es probable que la bursa pueda interferir con el desarrollo del testículo por bloquear la liberación de hormona luteinizante (LH) o por reducir el número de receptores a LH en el testículo (Aguilar *et al.*, 1981). Las adrenales muestran un incremento en el peso, acompañado con un aumento en

los cordones corticales aún cuando no se asocia un incremento en la secreción de corticosterona (Pedernera *et al.*, 1980a). En las hembras la bursectomía provoca la involución del oviducto (Pedernera *et al.*, 1980a; Pedernera *et al.*, 1985). La castración en los pollos conduce a un leve aumento en el tamaño de la bursa y no así en los faisanes.

De diversos experimentos realizados por Glick y colaboradores (1984), se establece que existe un control adrenal extrínseco e intrínseco en el desarrollo de la bursa.

Se ha demostrado la presencia de receptores a esteroides en células mesenquimatosas de la bursa embrionaria, en linfocitos, en los fibroblastos subepiteliales interfoliculares y las células del músculo liso que rodean la bursa de Fabricio (Sullivan y Wira, 1979; Ylikomi *et al.*, 1985; Ylikomi y Tuohima, 1989).

II 9. Función de la Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Durante el desarrollo embrionario en mamíferos, la zona fetal de la glándula adrenal sintetiza y libera grandes cantidades de dehidroepiandrosterona (DHEA) la cual sirve como precursor para la síntesis de estrógenos por la placenta. Una falla en la zona fetal de la adrenal embrionaria en la producción de cantidades adecuadas de DHEA resulta en una terminación prematura de la gestación. Después del nacimiento, la zona fetal cesa su función y degenera rápidamente. La zona reticular continúa sintetizando DHEA hasta

alrededor de los 20 años en humanos y posteriormente su producción declina (Figura 15) (Norris, 1985).

La DHEA y su conjugado sulfatado (DHEAS) son las hormonas esteroides más abundantes circulando en sangre de humanos y otros animales de sangre caliente (Bradley *et al.*, 1995); las concentración sérica de la DHEAS es 300-500 veces más alta que la DHEA y 20 veces más que cualquier otro esteroide (Ebeling y Koivisto, 1994). Mientras la DHEA ligada a la albúmina constituye un reservorio circulante, la DHEA libre, probablemente es activa a nivel tisular. Se considera que la DHEA es un andrógeno débil que se utiliza como precursor para andrógenos y estrógenos. Su concentración tiene grandes variaciones diurnas pero su importancia fisiológica aún es poco clara (Ebeling y Koivisto, 1994).

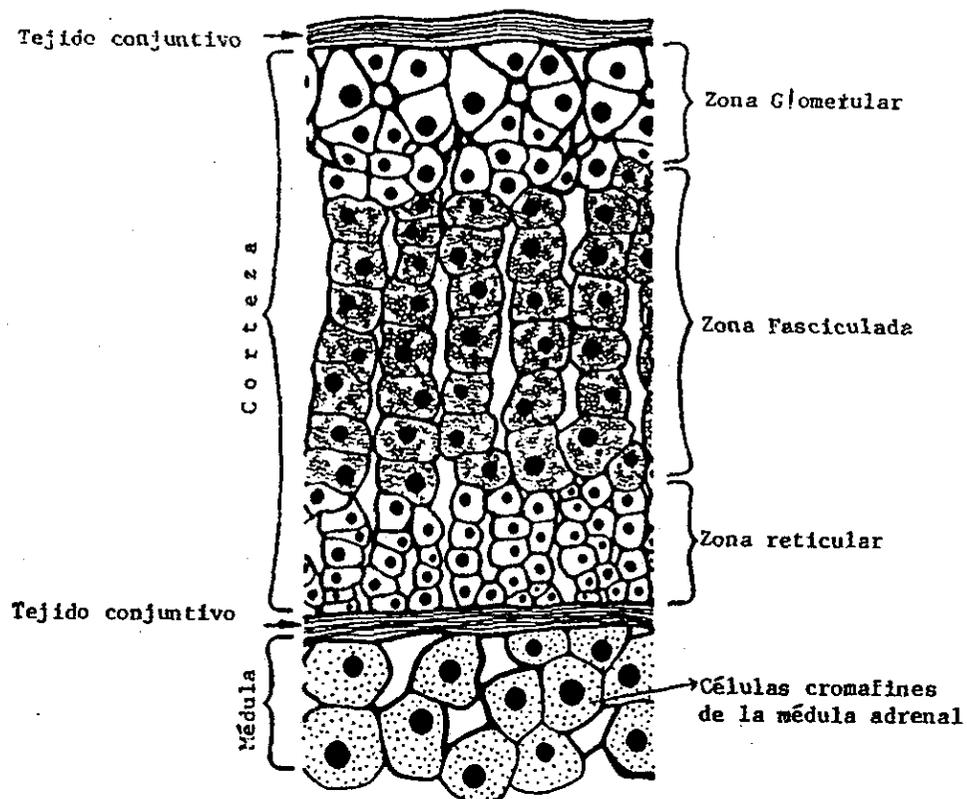


Figura 15. Esquema que muestra la disposición de la glándula adrenal de mamíferos (Tomada de Norris, 1985).

Algunos grupos han demostrado que la DHEA que se administra a ratones y ratas de laboratorio inhibe el desarrollo de tumores como el de vejiga, pulmón, hígado, piel y tejido linfático (Schwartz y Pashko, 1995). Se ha descrito la presencia de un receptor para DHEA por ensayos de unión en el citosol de las células de melanoma B16, en las cuales, se observó que se inhibe el crecimiento, se incrementa la producción de melanina y se induce su diferenciación, tal vez por la desregulación de la protein-cinasa (Kawai *et al.*, 1995). Existen fuertes evidencias de que la DHEA tiene un efecto antiproliferativo y un efecto

preventivo de neoplasias al inhibir a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la ruta de las pentosas. Esta ruta es una importante fuente de NADPH, un reductor crítico para muchas de las reacciones bioquímicas que generan radicales libres de oxígeno, los cuales pueden actuar como segundos mensajeros, que estimulan la hiperplasia. La DHEA puede ser metabolizada *in vivo* tanto a testosterona como a estrona por lo que puede tener efectos androgénicos y estrogénicos en animales de laboratorio. Por lo anterior su uso terapéutico en humanos puede estar limitado por el efecto que puede tener como hormona sexual (Schwartz y Pashko, 1995; Regelson *et al.*, 1994; Regelson y Kalimi, 1994).

Algunos grupos han encaminado sus investigaciones a valorar el efecto de estas hormonas en las mujeres premenopáusicas, proponiendo que la DHEA puedan tener un efecto como estrógeno o como andrógeno (Eberling y Koivisto, 1994).

Estudios realizados por Bradley y colaboradores (1995) demuestran que la DHEA y DHEAS, en diferentes concentraciones, inhiben la replicación del virus de inmunodeficiencia felina (FIV), sin alterar la viabilidad celular y la síntesis de ADN.

Otros estudios han demostrado la capacidad de sintetizar DHEA a partir de pregnenolona en el duodeno y el estómago, determinando la presencia del ARNm de la P450c17 (Valle *et al.*, 1995). Recientemente, se destaca el papel de la DHEA en el sistema nervioso que junto con la pregnenolona, son propuestos como neuroesteroides (Robel *et al.*, 1991; Baulieu y Robel, 1996)

La administración de DHEAS en cultivos primarios de hepatocitos de rata permitieron ver que esta hormona está relacionada con la regulación de la expresión de peroxisomas y del citocromo P-450 4A (CYP4A) enzimas activas en el metabolismo de los ácidos grasos. Al administrar DHEAS se induce ARNm de la CYP4A. Por estos resultados se piensa que la DHEAS participe como un regulador endógeno de los niveles enzimáticos de los peroxisomas hepáticos (Ram y Waxman, 1994). La DHEA utilizada en dosis farmacológicas en diferentes modelos experimentales ha demostrado que existe una influencia de esta hormona en el aumento del número de peroxisomas. La inducción de enzimas asociadas a los peroxisomas, causa hepatomegalia y hepatocarcinogénesis, en ratas, ratones y pollos (Rao *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1994).

II 10. Relación de la DHEA con el sistema inmunológico

Diversos grupos de investigadores han demostrado que la DHEA tiene una actividad inmunomoduladora (Danenberg *et al.*, 1995; Rasmussen *et al.*, 1995; Regelson *et al.*, 1994) y reguladora en la respuesta inmunológica mediada por células, lo cual ha sido asociado con un decremento en el riesgo de adquirir cáncer (Jacobson *et al.*, 1991).

Recientemente se ha sugerido que el decremento en la concentración de la DHEA y la DHEAS que ocurre con la edad está relacionado con la inmunidad de la senectud (Birkenhänger *et al.*, 1994), pues las concentraciones de DHEA gradualmente declinan después de la tercera década de vida alcanzando menos del 20 por ciento de los niveles máximos cuando se alcanzan los 60 años (Rasmussen *et al.*, 1995; Daynes *et al.*, 1990a y

b). La desregulación de la función inmunológica puede estar manifestada por un incremento en la producción de autoanticuerpos y un decremento en la producción de anticuerpos para los antígenos extraños, una desregulación en la síntesis de citocinas y un incremento en la producción de interleucina-4 (IL-4), IL-5 y IL-6 asociada con un decremento en la IL-2 (Weksler, 1993). En experimentos en los que se ha administrado DHEA a ratones viejos se ha visto que se corrigen los defectos inmunológicos provocados por la edad (Danenberg *et al.*, 1995). En otros estudios en los que se han tratado linfocitos de ancianos con DHEA o linfocitos de ratones viejos con DHEAS se ha visto que hay un aumento en la respuesta inmunológica por anticuerpos y se detiene la desregulación en la producción de la citocinas por los linfocitos T (Weksler, 1993).

Recientes estudios indican que tratamientos con DHEA tiene un estímulo en la respuesta inmunológica, pues se ha demostrado que este esteroide tiene una influencia antagónica a la de los glucocorticoides (Daynes *et al.*, 1990a y b; Blauer *et al.*, 1991). También se ha descrito que la DHEAS o la DHEA incrementan la producción de IL-2 por los linfocitos (Blauer *et al.*, 1991). En ratones infectados con *Cryptosporidium parvum* tratados con dexametasona y posteriormente tratados con DHEA se demostró que se reduce significativamente la infección y se produce un aumento en el número de células T esplénicas, células T CD4⁺ y células B (Rasmussen *et al.*, 1995).

Algunos estudios con DHEA han determinado que es capaz de aumentar el potencial de producción de las células T de murinos de IL-2 y su subsecuente activación. Además de

tener un efecto directo sobre las células T *in vitro*, la DHEA provoca en animales normales o tratados con glucocorticoides (GC), un aumento en la capacidad de producir IL-2 en las células T, en respuesta a una estimulación antigénica. Al parecer la DHEA es responsable de tener una influencia epigenética sobre el tráfico continuo de las células T en los órganos linfoides periféricos (Daynes *et al.*, 1990a y b). También se ha propuesto que la DHEA modula la función de las células T mediada como hipersensibilidad de tipo retardada en ratones, además *in vitro*, células del bazo de estos ratones producen más interferon *gamma* (IFN γ) y menos IL-4 y IL-6, al tratarse con DHEA (Kim *et al.*, 1995).

Contrariamente a las evidencias experimentales presentadas por diversos grupos sobre el papel inmunomodulador y regulador de la DHEA, Pahlavani y Harris (1995) demostraron que *in vitro* el tratamiento de DHEA parece no tener efectos inmunomodulatorios sobre los cambios relacionados con la edad, en la proliferación inducida por mitógenos o sobre la producción de citocinas por los linfocitos de rata. Incluso existen trabajos como el de Menotetang y colaboradores (1996) en el que se describe un efecto negativo de la DHEA y prednisolona sobre la proliferación de linfocitos de rata que han sido estimulados con fitohemaglutinina, aunque el efecto inhibitorio es menor con la DHEA con respecto a la prednisolona. Ellos sugieren que estos dos andrógenos pueden utilizarse en terapias antiinflamatorias.

Se ha demostrado por métodos bioquímicos, de inmunotinción y autorradiográficos la presencia de receptores a estrógenos, a andrógenos, a progesterona y a glucocorticoides en las células reticuloepiteliales del timo (McGimsey *et al.*, 1991).

Con los antecedentes antes mencionados, es evidente que existen muchas preguntas aún por resolver sobre algunos aspectos funcionales de la Bursa de Fabricio y mas aún sobre el papel de la DHEA y la DHEAS en el sistema inmunológico. Es por esa razón que nos interesa de manera particular abordar los siguientes puntos.

III. Planteamiento del problema

Los antecedentes bibliográficos antes mencionados establecen que existe una relación entre la función de la bursa de Fabricio y las hormonas esteroides. Sin embargo, en esta relación existen aún interrogantes por resolver, ya que el efecto de los esteroides sobre la bursa de Fabricio indican una influencia inhibitoria, pues cuando se administra durante el desarrollo embrionario provoca la ausencia de la bursa de Fabricio, y cuando se administra durante periodos postnatales se provoca la regresión de la bursa de Fabricio (Szernberg, 1976; Gasc y Stumpf, 1981; Lupetti *et al.*, 1983). Con la admistración de distintos esteroides en dosis diferentes, se han obtenido efectos de inhibición y estimulación dependiendo del tipo de esteroide y la dosis administrada (Norton y Wira, 1977).

Se ha demostrado por métodos bioquímicos, de inmunotinción y autorradiográficos la presencia de receptores a estrógenos, a andrógenos, a progesterona y a glucocorticoides en las células retículoepiteliales del timo (McGimsey *et al.*, 1991).

Con los antecedentes antes mencionados, es evidente que existen muchas preguntas aún por resolver sobre algunos aspectos funcionales de la Bursa de Fabricio y mas aún sobre el papel de la DHEA y la DHEAS en el sistema inmunológico. Es por esa razón que nos interesa de manera particular abordar los siguientes puntos.

III. Planteamiento del problema

Los antecedentes bibliográficos antes mencionados establecen que existe una relación entre la función de la bursa de Fabricio y las hormonas esteroides. Sin embargo, en esta relación existen aún interrogantes por resolver, ya que el efecto de los esteroides sobre la bursa de Fabricio indican una influencia inhibitoria, pues cuando se administra durante el desarrollo embrionario provoca la ausencia de la bursa de Fabricio, y cuando se administra durante periodos postnatales se provoca la regresión de la bursa de Fabricio (Szernberg, 1976; Gasc y Stumpf, 1981; Lupetti *et al.*, 1983). Con la admistración de distintos esteroides en dosis diferentes, se han obtenido efectos de inhibición y estimulación dependiendo del tipo de esteroide y la dosis administrada (Norton y Wira, 1977).

En el caso muy particular de la DHEA y su derivado sulfatado DHEA-S existe controversia en cuanto a su función biológica y mas aún en su participación en la regulación de los procesos inmunológicos, y aunque se piensa que puede tener una participación muy importante en la respuesta inmunológica, es poco lo que se conoce hasta estos momentos. Las evidencias experimentales apuntan a que la DHEA puede participar aumentando la respuesta inmunológica, sin embargo existen investigaciones que demuestran todo lo contrario.

Es por estas razones que para nosotros resulta de interés conocer la influencia que puede tener la DHEA sobre la bursa de Fabricio, un órgano linfoide exclusivo de las aves, encargado de la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos B.

IV. Objetivos

En el presente trabajo se evalua el efecto que tiene la DHEA sobre la bursa de Fabricio de pollos recién nacidos, cuando la hormona se administra durante el desarrollo embrionario del pollo en dosis fisiológicas de manera sostenida. Para valorar dicho efecto se plantearon como objetivos generales:

- 1.- Establecer si la bursa de Fabricio tiene una relación funcional con la DHEA.

En el caso muy particular de la DHEA y su derivado sulfatado DHEA-S existe controversia en cuanto a su función biológica y mas aún en su participación en la regulación de los procesos inmunológicos, y aunque se piensa que puede tener una participación muy importante en la respuesta inmunológica, es poco lo que se conoce hasta estos momentos. Las evidencias experimentales apuntan a que la DHEA puede participar aumentando la respuesta inmunológica, sin embargo existen investigaciones que demuestran todo lo contrario.

Es por estas razones que para nosotros resulta de interés conocer la influencia que puede tener la DHEA sobre la bursa de Fabricio, un órgano linfoide exclusivo de las aves, encargado de la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos B.

IV. Objetivos

En el presente trabajo se evalúa el efecto que tiene la DHEA sobre la bursa de Fabricio de pollos recién nacidos, cuando la hormona se administra durante el desarrollo embrionario del pollo en dosis fisiológicas de manera sostenida. Para valorar dicho efecto se plantearon como objetivos generales:

- 1.- Establecer si la bursa de Fabricio tiene una relación funcional con la DHEA.

2.- Aportar información del efecto de la DHEA sobre la bursa de Fabricio, pues es poco el conocimiento de la influencia de esta hormona esteroide sobre la bursa de Fabricio.

3.- Aportar información que ayude a establecer si la DHEA tiene una participación estimuladora o inhibitoria sobre la estructura histológica de la bursa de Fabricius.

Para cumplir estos objetivos pretendemos demostrar los siguientes objetivos específicos:

1. Que el desarrollo y maduración de los folículos linfoides de la bursa sea más rápido en los organismos tratados que en los testigo.

2.- Que la administración de la DHEA en dosis fisiológicas, favorecerá la maduración del folículo linfoide y promoverá la diferenciación de algunas de las células que constituyen el folículo linfoide de la bursa como las: células epiteliales asociadas al folículo FAE, las células reticuloepiteliales Rep., las células dendriticas secretoras SDC, las células histiocíticas, los linfocitos y los linfoblastos.

V. Materiales y Métodos

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron embriones de pollo de engorda de la línea Arbor Acres obtenidos de la granja incubadora de Atongo II en Querétaro Qro. La incubación se llevó a cabo en una incubadora *Chicken Master* a una temperatura de 37.8°C, con una humedad relativa de 80 por ciento y circulación forzada de aire.

MÉTODOS

Los embriones de pollo se organizaron en dos grupos testigo y tratado. Al grupo de embriones tratados, previo a la incubación se les aplicó sobre el cascarón por aspersión una solución de DHEA a una concentración de 120 mg/ml en solución de alcohol etílico al 30 por ciento. Después de 21 días de incubación, cada huevo absorbió a través del cascarón una concentración aproximada de 2 nM de la hormona (Rubio, 1992). Al nacimiento, los pollos testigos y tratados se sacrificaron por decapitación y las bursas obtenidas se destinaron para diferentes métodos de estudio.

V 1. Determinación del ADN total

Se sacrificaron los pollos al nacimiento por decapitación y se disecaron las bursas, se midió el peso húmedo de las bursas y se colocaron en tubos de ensaye de 3 ml, se les agregó 1 ml de solución salina al 0.15 M. Se homogeneizaron en frío con un politron marca Brinkmann Instrument modelo 8967 con un vástago de 5 mm de diámetro durante 15 segundos a una

velocidad baja (velocidad tres de una escala de diez); de ahí se tomaron 25 μ l por triplicado para la determinación de proteínas totales por el método de Bradford y 10 μ l por triplicado para la determinación de ADN total por el método de Santoianni Santoianni y Ayala (1965). El resto del homogenado se congeló.

Del homogenado se tomaron 10 μ l para la determinación de ADN, y se siguió el procedimiento del método de Santoianni, el cual se describe a continuación. Agregar al homogenado 490 μ l de agua destilada. Agitar. Agregar 100 μ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 1 μ g/ml Agregar 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 40 por ciento. Incubar toda la noche a 4°C. Centrifugar a 800 g a 4°C, durante 10 minutos. Decantar, agregar al botón 500 μ l de TCA al 10 por ciento; agitar, centrifugar a 800 g, a 4°C durante 10 minutos. Aspirar el sobrenadante y escurrir bien. Agregar al pellet 20 μ l de dehidroclorato de ácido 3,5- diamino benzoico (3,5-DABA) (Aldrich Chemical). Poner en baño María durante 30 minutos a 60°C. Detener la reacción con 1.5 ml de ácido perclórico (HClO₄) al 0.6 N. Centrifugar 800 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Leer las muestras en el fluorómetro poniendo en la celdilla el sobrenadante por decantación. Las lecturas se hicieron por triplicado. La curva patrón de ADN se preparo con ADN de esperma de salmón. Las concetraciones de ADN consideradas para la curva patrón fueron de 0.1 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g, 5 μ g y 6 μ g. El blanco fue ácido perclórico al 0.6 N. El 3,5-DABA se preparo de la siguiente manera: a 680mg de 3,5-DABA agregarle 2 ml de agua destilada, agitar y agregar carbón dextrán. Se pasa por el vortex y centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente. Filtrar en embudo de plástico con papel filtro

Whatman del No. 1. Recoger el filtrado en un tubo de plástico. Utilizar la solución del 3,5-DABA recién preparada. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga Sorvall DUPONT RT 6000B refrigerada. El baño María que se utilizó fue marca THELCO modelo 85. Las lecturas del ADN se hicieron en un fluorómetro TURNER modelo 110 con un filtro primario de 405 nm y un filtro secundario de 520 nm

V 2. Determinación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas se tomaron 25 μ l. del homogenado por triplicado. Se les agregó 75 μ l de solución salina 0.15 M para tener un volumen de 100 μ l en total y posteriormente agregar 1 ml del reactivo de Bradford (Bradford, 1976). El reactivo de Bradford se preparó en el momento de la siguiente manera: a 100 mg de azul de Coomassie G250 (Merck) agregar 50 ml de etanol absoluto, ácido fosfórico (SIGMA) 100 ml y aforar a un litro con agua destilada. Agitarse constantemente. La curva patrón para la medición de proteínas se hizo con albúmina sérica bovina (BSA) considerando concentraciones de 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g, y 100 μ g. El blanco se preparó con reactivo de Bradford solamente. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a una longitud de onda de 575 nm

Se utilizaron 12 experimentos para la determinación de ADN y proteínas totales.

V3. Procesamiento del material biológico para microscopía óptica

Se sacrificaron los pollos por decapitación y rápidamente se procedió a disecar la bursa de Fabricio. Las bursas se fijaron en el líquido de Bouin por una hora y posteriormente se postfijaron en formol amortiguado al 10 por ciento por 24 horas, se deshidrataron para la técnica de inclusión y corte en parafina. Los cortes de 5 μm de grosor en sentido transversal, se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson, y las técnicas especiales de Gomori para fibras reticulares y la de bromuro de etidio para ADN. Se utilizaron 9 experimentos con ocho animales cada uno.

Las bursas de dos experimentos de cuatro animales cada uno se destinaron para realizar cortes por congelación, para los que se siguió la siguiente metodología. Se sacrificaron los pollos por decapitación y rápidamente se procedió a disecar las bursas de Fabricio, las que se colocaron en cápsulas beem y se les incluyó en O.C.T., se congelaron a -70°C en un REVCO. Se realizaron cortes por congelación de $10\mu\text{m}$ de grosor en sentido transversal en un criostato American Optical. Se montaron en portaobjetos preparados con poli-L-lisina (SIGMA) al 0.1%. Se fijaron los cortes en acetona absoluta por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se secaron al aire por 20 minutos. Se enjuagaron con PBS dos cambios de 10 minutos cada uno. Se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de ácido peryódico al 0.28% por 30 segundos a temperatura ambiente. Fueron lavados en PBS durante 10 minutos dos cambios. Luego se pasaron por una solución de PBS+ albumina sérica bovina BSA al uno por ciento+Tritón X-100 al 0.01 por ciento por una hora a 37°C . Se escurrieron perfectamente bien y se pusieron a incubar con el anticuerpo monoclonal

Tap-1 (anticuerpo monoclonal anti-moléculas clase II de pollo; Oliver y LeDouarin, 1984; Guillemont *et al.*, 1984) en una dilución 1:100 en una solución de PBS+BSA al 0.1% por 18 h a 4° C. Se lavaron tres veces por cinco minutos en cada cambio en PBS a 4°C. Se incubaron en el anticuerpo secundario biotinilado (rabbit anti-mouse IgG Zymed, LA) por una hora a 4°C, se lavaron y se incubaron en una solución con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, se lavaron y se incubaron con la mezcla sustrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno al tres por ciento-aminoetilcarbazol), se lavaron en agua destilada, se contrastaron con hematoxilina de Mayer por tres minutos, se lavaron en agua corriente por cinco minutos y se montaron con Aquamount.

Las bursas de tres experimentos de 10 animales cada uno, se destinaron para fijarlas en glutaraldehído al 2.5 por ciento en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.2M, pH 7.2, durante dos horas y una postfijación en tetróxido de osmio al uno por ciento en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.2M, pH 7.2, por una hora para posteriormente incluir en resina Epon. Los cortes semifinos de un μm de grosor los que se tiñeron con azul de toluidina bórax.

V 4. Estudios morfométricos por microscopía óptica

Las preparaciones histológicas se destinaron para estudios morfométricos. Se midió el área del botón de la células FAE y el diámetro de los folículos linfoides. Todas las mediciones se realizaron con doble ciego. Para medir el área del botón de las células FAE, se tomó el diámetro mayor y menor del botón y después con la fórmula de la elipse se calculó el área

del botón folicular. Se midieron 30 botones de células FAE por corte con el objetivo de 63X (Plan neofluar 63/1.25 oel, Ph 3). Se establecieron criterios para la medición del diámetro folicular. Para medir el diámetro mayor y menor de los folículos linfoides se tenía que presentar el botón FAE o la estructura que semeja el corpúsculo de Hassal. Se midieron 30 folículos por corte con el objetivo de 16X (Plan neofluar 16/0.50/mm). Todas las mediciones se realizaron en un microscopio Zeiss convencional y un ocular micrométrico.

A los cortes por parafina se les aplicó la técnica de bromuro de etidio que se cita a continuación. Desparafinar en xilol e hidratar hasta agua destilada. Tratar con una solución de RNAasa a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ a 37° C por dos horas. Lavar con PBS. Bloquear la autofluorescencia del tejido con una solución de cloruro de amonio 50 μM +lisina al 0.01 por ciento a pH 4 durante una hora a temperatura ambiente. Esta solución se prepara en el momento. Incubar en una solución de bromuro de etidio al 10 $\mu\text{g/ml}$ por 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar en PBS. Montar en permount. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus modelo BX40 con un filtro para rodamina. Con una cámara CCD marca JVC modelo TK1280E se capturaron las imágenes y se digitalizaron con un digitalizador Synoptex. Las imágenes se analizaron con el programa PC Image de Foster Findlay Associaters para contar el número de células en apoptosis por folículo en cada caso y el número de células en apoptosis por área folicular.

En los cortes por congelación a los que se les aplicó la técnica de inmunocitoquímica para células Tap-1⁺ (Ia⁺) se contó el número de células Tap-1⁺ (Ia⁺) y se midió el área del folículo en el cual se habían contado las células. Con una cámara CCD marca SONY adaptada a un microscopio Zeiss convencional, se capturaron las imágenes en un monitor a color SONY. Las imágenes se analizaron con el programa de análisis de imagen Image Pro Plus (IPPLUS). Se consideraron 20 folículos por corte con el objetivo de 16X (Plan 16/0.32).

En los cortes semifinos se contaron los linfocitos y número de mitosis en los folículos, considerando las células que se encontraran dentro del recuadro menor del marco de encuadre para las fotomicrografías (este recuadro tiene un área de 4505 μm^2). El conteo de los linfocitos y de las células en mitosis se realizaron en un microscopio Zeiss convencional con el objetivo de 100X (Plan Apo100/1.3 oel, Ph3).

V 3. Estudios de captación de tinta china

A un grupo de pollos recién nacidos testigo y otro tratado con DHEA se les administró 500 μl de tinta china sin diluir (Rotring para dibujo) con una micropipeta GILSON de 1000 μl por la cloaca, después de tres horas se sacrificaron por decapitación. Las bursas se abrieron por la parte media se fijaron en el líquido de Bouin por una hora y posteriormente se postfijaron en formol amortiguado al 10 por ciento por 24 horas, se deshidrataron para la técnica de inclusión y corte en parafina; los cortes de 5 μm de grosor los cuales se tiñieron con eosina. Se valoró la captación de tinta china por bursa observando al microscopio

óptico la presencia de tinta china en los botones de las células epiteliales asociadas al folículo. En los casos en los que se presentó tinta china en el interior de los botones de células FAE se midió la cantidad de tinta china por medio de un densitómetro Zeiss modelo D-7082, con un diafragma de 1.6 mm adaptado a un microscopio Zeiss convencional. La medición de la tinta china se hizo tomando como referencia y blanco un campo en el que no hubiese ni tejido ni tinta. Se calibraba en ese campo, dejando en la ventana de lectura 1.0000. Posteriormente se pasaba al campo donde se encontraban las células FAE con tinta y se obtenía la medición. La lectura obtenida de las células FAE con tinta se restó de la lectura de calibración hecha a 1.0000 del campo blanco que se tomó de referencia y la diferencia obtenida de estas dos lecturas se tomó como la absorvancia. Se midieron 20 campos por corte con el objetivo de 63X (Plan neofluar 63/1.25 oel, Ph 3).

V 4. Análisis estadístico

A los resultados obtenidos del peso húmedo, ADN total, proteínas totales, diámetro folicular mayor y menor, cuenta de linfocitos y número de mitosis se les aplicó un análisis multivariado (MANOVA). Para los datos de la cuenta de linfocitos y número de mitosis se requirió sacarles logaritmo natural, además de calcular la densidad numérica. El análisis multivariado MANOVA se aplicó con el propósito de determinar (1) la interrelación entre diferentes variables y (2) las diferencias entre las medias de las variables. El análisis multivariado (MANOVA) utilizó las pruebas de *Wilks' Lambda*, *Pillai's trace*, *Hottelling-Lawley Trace* y *Roy's greatest*, para determinar la proporción de varianza entre las

variables consideradas además de manejar el tratamiento y el sexo como factores que pudieran estar interviniendo en los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos de la medición del área de las células FAE, del número de células en apoptosis y de las mediciones de absorvancia en los botones de células FAE que contenían tinta china en su interior, se analizaron estadísticamente por medio de Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para determinar si existía un efecto combinado por el tratamiento con DHEA y el sexo de los animales. Para el número de células Tap (Ia^+) se aplicó una prueba de T para determinar las diferencias por el tratamiento. También se empleó una χ^2 para comparar los resultados de captación de tinta china por bursa para determinar las diferencias por el tratamiento. Se utilizaron los paquetes estadísticos de *Statgrafics* y *SAS*.

VI. RESULTADOS

VI 1. Determinación de proteínas y ADN total

La cantidad de ADN y proteínas totales relacionadas con el peso húmedo de la bursas en los animales testigos y tratados no mostraron diferencias significativas entre ellos. Esto indicó que las medias del peso húmedo, ADN total y proteínas totales no varían entre los animales testigos y tratados con DHEA. El tratamiento con DHEA y el sexo no influyeron de manera individual o en conjunto sobre el peso húmedo, el ADN total y las proteínas

variables consideradas además de manejar el tratamiento y el sexo como factores que pudieran estar interviniendo en los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos de la medición del área de las células FAE, del número de células en apoptosis y de las mediciones de absorvancia en los botones de células FAE que contenían tinta china en su interior, se analizaron estadísticamente por medio de Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para determinar si existía un efecto combinado por el tratamiento con DHEA y el sexo de los animales. Para el número de células Tap (Ia^+) se aplicó una prueba de T para determinar las diferencias por el tratamiento. También se empleó una χ^2 para comparar los resultados de captación de tinta china por bursa para determinar las diferencias por el tratamiento. Se utilizaron los paquetes estadísticos de *Statgrafics* y *SAS*.

VI. RESULTADOS

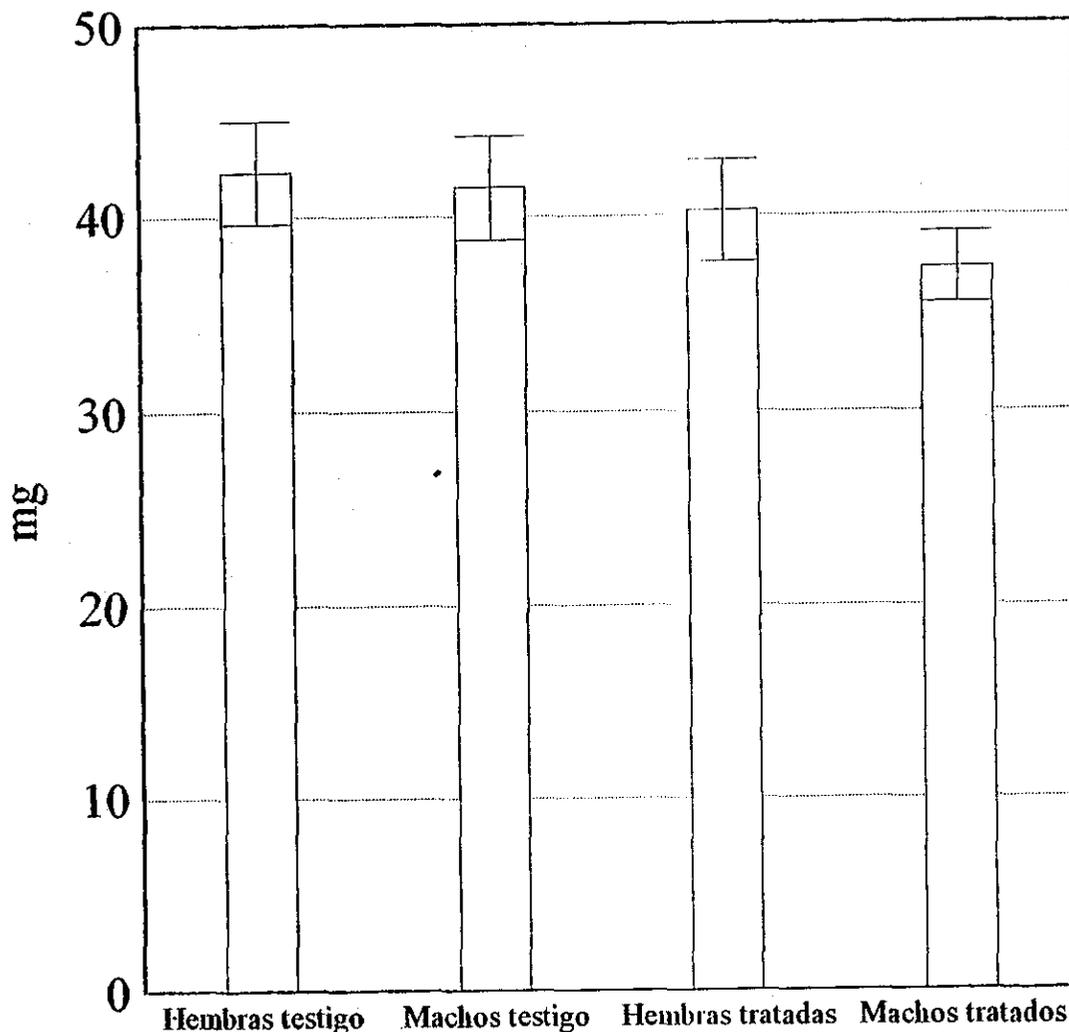
VI 1. Determinación de proteínas y ADN total

La cantidad de ADN y proteínas totales relacionadas con el peso húmedo de la bursas en los animales testigos y tratados no mostraron diferencias significativas entre ellos. Esto indicó que las medias del peso húmedo, ADN total y proteínas totales no varían entre los animales testigos y tratados con DHEA. El tratamiento con DHEA y el sexo no influyeron de manera individual o en conjunto sobre el peso húmedo, el ADN total y las proteínas

totales. Con el análisis estadístico se mostró que no hay diferencias por el tratamiento o por el sexo y que estos en ningún momento muestran interacción para las variables consideradas. Los resultados obtenidos del análisis estadístico mostraron que para el peso húmedo no existen diferencias significativas, tratamiento ($p = 0.8765$); sexo ($p = 0.9974$); de la interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.6841$). Las pruebas del análisis estadístico de las proteínas totales demostraron que no existen diferencias significativas, tratamiento ($p = 0.5967$); sexo ($p = 0.7777$); de la interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.6136$). Las pruebas del análisis estadístico para el ADN total demostraron que no existen diferencias significativas, tratamiento ($p = 0.8019$); sexo ($p = 0.8235$); de la interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.7068$). Cuadro 2, Gráficas 1, 2 y 3.

Gráfica 1

Peso húmedo de la bursa



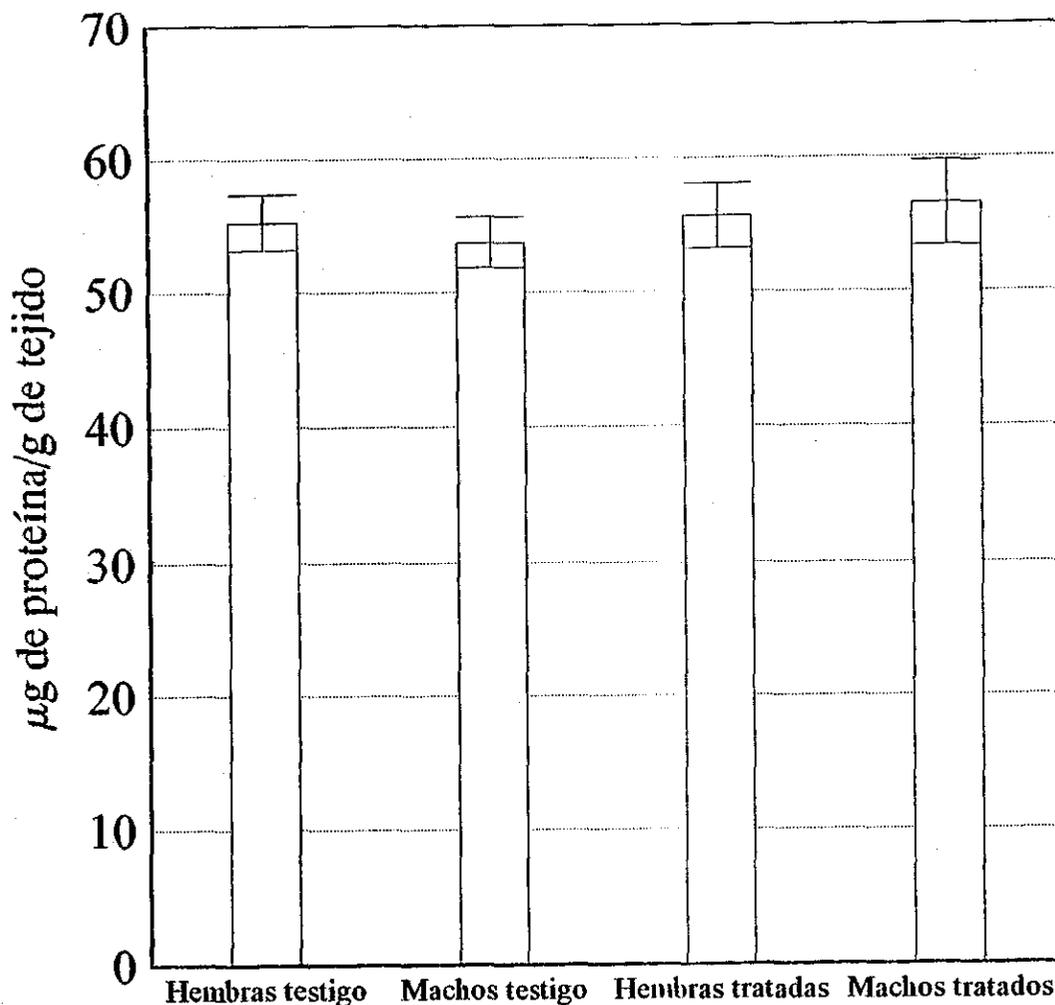
n=26 p = 0.5604

Los resultados de los análisis de varianza y multivariado se muestran en el cuadro 1.

No existen diferencias significativas entre los grupos $p > 0.005$
Se presentan las medias con sus intervalos de confianza

Gráfica 2

Proteínas totales de la bursa



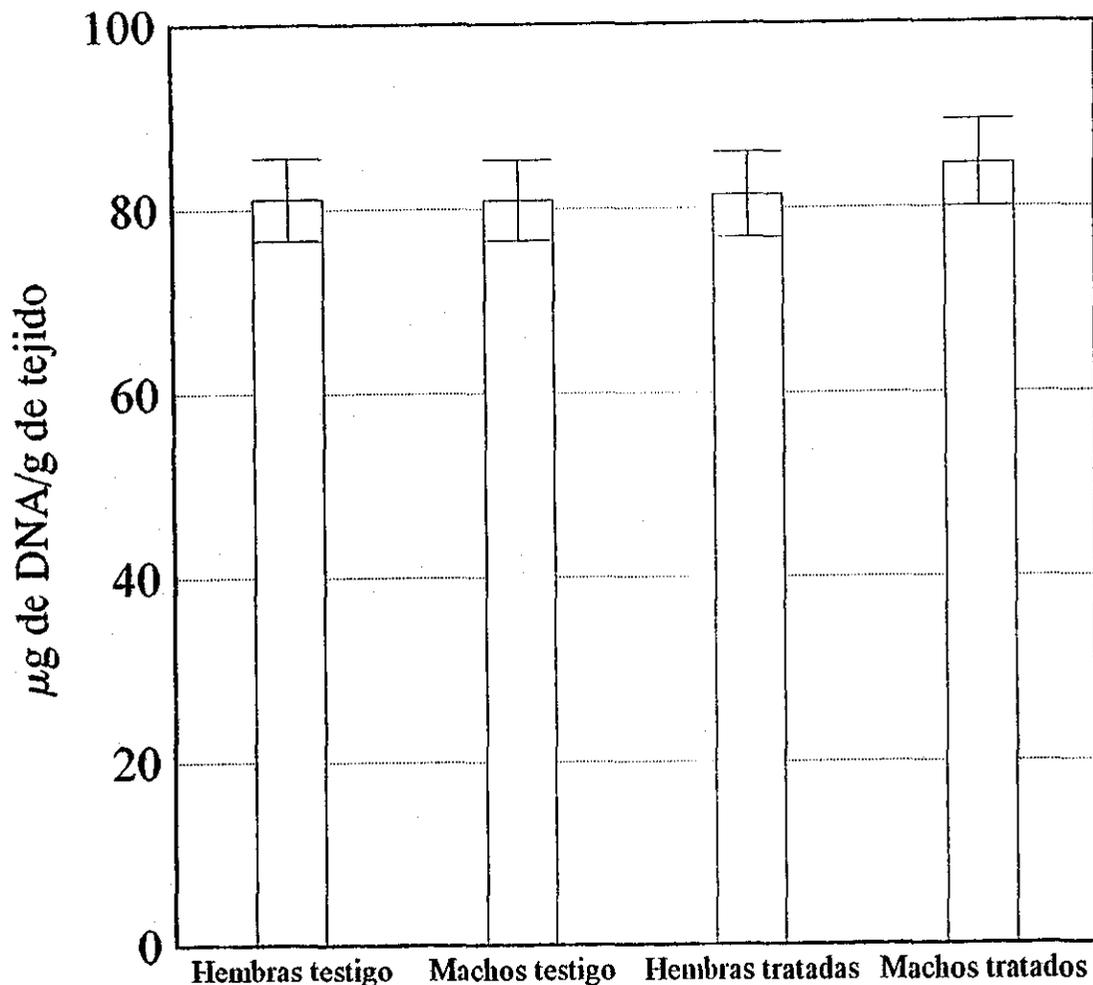
n = 26 p = 0.8861

Los resultados de los análisis de varianza y multivariado se muestran en el cuadro 1

No hubo diferencias significativas entre los grupos $p > 0.005$.
Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

Gráfica 3

DNA total de la bursa



n = 26 p = 0.7068

Los resultados de los análisis de varianza y multivariado se muestran en el cuadro 1

No existen diferencias significativas entre los grupos $p > 0.005$
Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

Cuadro 2

Grupo	Peso Húmedo (mg)	Proteínas Totales (µg/gr. de tejido)	ADN total (µg/gr. de tejido)
Hembras testigo	42.34 ± 2.69	55.36 ± 2.08	81.12 ± 4.50
Machos testigo	41.50 ± 2.69	53.78 ± 1.92	80.96 ± 4.36
Hembras tratadas	40.27 ± 2.61	55.72 ± 2.40	81.46 ± 4.61
Machos tratados	37.34 ± 1.81	56.59 ± 3.14	84.77 ± 4.69

n = 26 por cada grupo

Las pruebas de *Wilks' Lambda*, *Pillai's trace*, *Hottelling-Lawley Trace* y *Roy's greatest*, que se aplicaron para determinar la proporción de varianza entre el peso húmedo, la cantidad total de ADN y la cantidad total de proteínas, no mostraron diferencias significativas.

VI 2. Estudios morfológicos con microscopía óptica

La estructura histológica de la bursa de Fabricio de los organismos testigos y tratados con DHEA mostró la presencia de una capa serosa delgada constituida por un epitelio plano simple y tejido conjuntivo, seguida por una capa muscular no muy gruesa constituida por fibras musculares que corren en sentido longitudinal y circular; en la luz de la bursa se mostró la presencia de plicas, las que se encontraron constituidas por los folículos linfoides

(Figura 16), en la porción del epitelio de revestimiento de cada una de las plicas se observó la presencia de un epitelio pseudosestratificado cilíndrico secretor característico del aparato digestivo que es interrumpido por la presencia de las células FAE (Figura 17).

Los resultados obtenidos de las observaciones de los folículos linfoides muestran que desde el punto de vista morfológico los animales tratados con DHEA tienen cualidades estructurales que revelan un mayor grado de desarrollo del folículo linfoide.

Las características morfológicas que se observaron en el epitelio de revestimiento mostró una diferenciación clara de las células FAE, las que en los organismos tratados con DHEA, se observaron como células globosas altas, de citoplasma claro con un núcleo ovoide y que resaltaron del epitelio interfolicular por parecer un tapón sobre los folículos linfoides (Figuras 18a y b). La presencia de estas células FAE en los organismos tratados con DHEA se observó con mayor frecuencia en las plicas de la bursa (Figuras 18c y d).

Otra característica morfológica que denotó diferencias entre los folículos linfoides de los organismos tratados con DHEA, fue la presencia de una corteza y una médula. (Figuras 19a, b y c). Conjuntamente a la clara definición de la corteza de los folículos linfoides, la porción medular mostró una densidad celular mayor, dando un aspecto más apretado entre las células (Figuras 18c, 18d, 20a y b). La presencia de células en mitosis en la región medular y cortical de los folículos linfoides de los organismos tratados con DHEA (Figuras 19b y c) fue otra característica constante (Figuras 20a, 20b, 21a y b). Se observó la

presencia de células en apoptosis en el interior de los folículos linfoides, pero con una aparición menor que en los testigo, en los que los cuerpos apoptóticos fueron muy evidentes (Figuras 22a y b). En la médula de los folículos linfoides de los organismos tratados con DHEA, fue notoria la presencia de estructuras semejantes a los corpúsculos de *Hassall* (Figuras 23a y b). En los organismos testigo este tipo de estructuras fueron menos frecuentes (Figuras 24a y b) y además fue común observar esta estructura en etapas de formación (Figuras 25a y b). La vascularización fue semejante en ambos grupos (Figuras 26a y b). En la porción basal del borde folicular se observó la presencia de heterófilos (Figuras 26a y b), que en el caso de los animales testigo fueron mas evidentes (Figuras 27a y b). El tejido conjuntivo mostro diferencias en su apariencia, siendo mas laxa en el caso de los organismos testigo y un arreglo mas apretado para los animales tratados con DHEA (Figuras 20a, 20b, 23a, 23b, 26a y b).

Las fibras reticulares, demostradas con la técnica de Gomori, constituyen el estroma de las plicas de la porción cortical de los folículos linfoides y la membrana basal sobre la que descansa el epitelio de revestimiento (Figura 28a). Las fibras reticulares no se presentaron en la porción en la que se localizaron las células FAE y en la región medular de los folículos linfoides (Figuras 28b y c). Las fibras reticulares mostraron su morfología característica formando redes que se anastomosan y ramifican, ajustándose a la forma del folículo linfoide, al observarse que constituyen agrupaciones gruesas en la zona que delimita a cada uno de los folículos linfoides, y fibras sumamente finas que se introducen hacia la región que forma la corteza (Figuras 28b y c). Se apreció de manera constante una mayor

penetración de fibras reticulares muy finas en la región cortical de todos los folículos linfoides de los organismos tratados con DHEA (Figuras 28b y c)

Las células Tap-1⁺ que se identificaron como células dendríticas secretoras (Ia⁺) se demostraron en ambos grupos, localizándose principalmente en la porción medular, aunque en algunos casos la reacción se localizó en células ubicadas en el botón de células FAE (Figuras 29a y b). En los pollos testigos las células Tap-1⁺ (Ia⁺) tuvieron una apariencia morfológica esférica manifestando la ausencia de prolongaciones citoplasmáticas largas (Figuras 30a y b), a diferencia de los pollos tratados en los que estas células Tap-1⁺ (Ia⁺) mostraron una morfología con una mayor cantidad de proyecciones citoplasmáticas gruesas (Figuras 30a y b), dándoles un aspecto más dendrítico, como si estuvieran envolviendo a los linfocitos (Figuras 31a y b).

VI 3. Estudios morfométricos con microscopía óptica

Los resultados de los estudios morfométricos demostraron que solamente en algunas de las estructuras consideradas existen diferencias significativas.

El área de las células FAE de los animales testigos y tratados es diferente ($F= 2.54$, $p=0.05$). El área del botón de células FAE es mayor en los animales tratados con DHEA. Del análisis de varianza de los datos del área del botón de células FAE al relacionarlo con

el tratamiento demostró un aumento significativo ($F=7.25$ $p=0.0082$), que para el caso del sexo no mostró diferencias significativas ($F=0.11$, $p=0.7458$). Al valorar la interacción del tratamiento con el sexo se demostró que no existe interacción. Cuadro 3; Gráfica 4

Cuadro 3

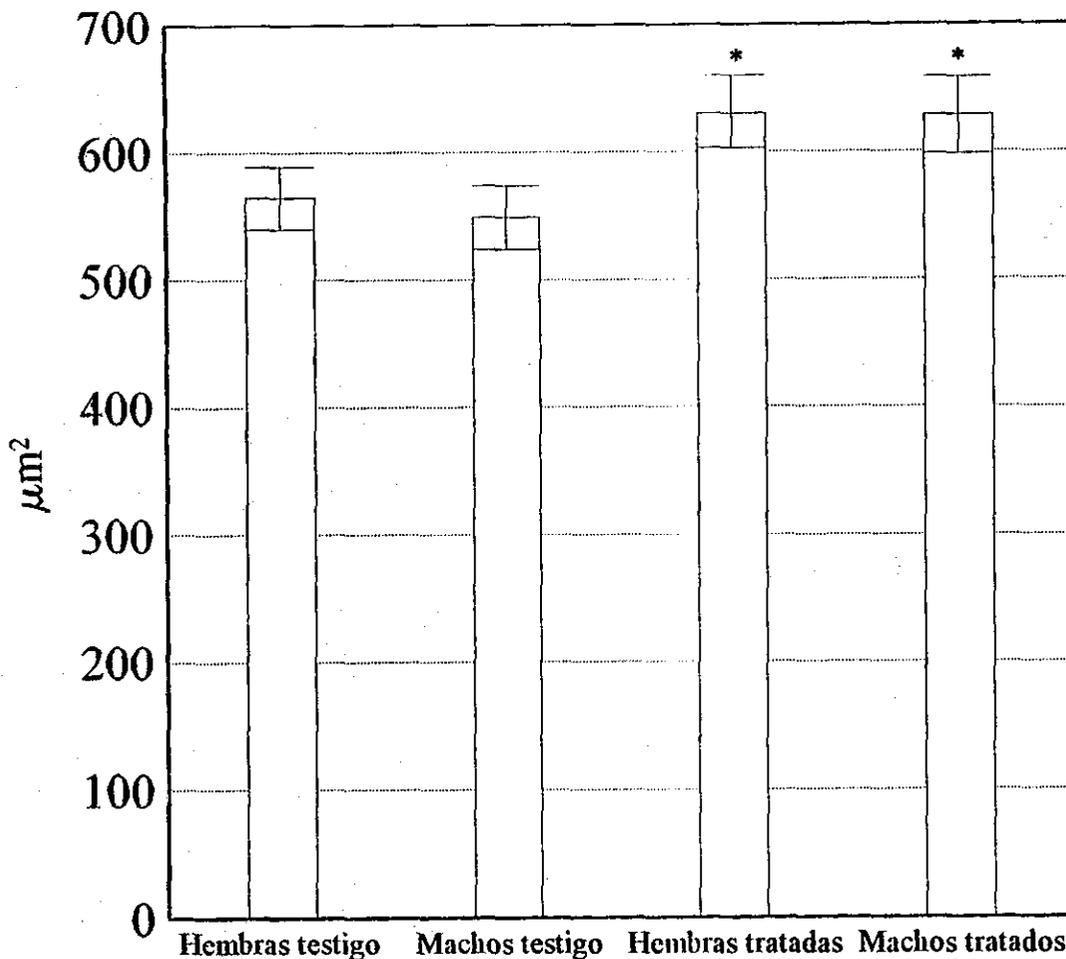
Grupo	Área de las células epiteliales asociadas al folículo (FAE) (μm^2)
Hembras testigo	564.79 \pm 24.40
Machos testigo	549.07 \pm 25.04
Hembras tratadas	629.73 \pm 26.95
Machos tratados	628.07 \pm 30.10

n = 30 por cada grupo

Los resultados que se obtuvieron del análisis de varianza aplicado al logaritmo del número de linfocitos y número de mitosis se demostró que no existen diferencias significativas para el número de linfocitos ($p = 0.9452$); al considerar el tratamiento y el sexo no se demostraron diferencias significativas ($p = 0.7906$) ($p = 0.6107$), respectivamente. No se observó interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.8492$).

Gráfica 4

Área de las células epiteliales asociadas al folículo linfoide



n = 30 * p = 0.0082

Los resultados del análisis de varianza se muestran en el cuadro 5.
Existen diferencias significativas en el area del boton de las células epiteliales
Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

De acuerdo al análisis estadístico el número de mitosis de los organismos testigos y tratados no mostraron diferencias significativas ($p = 0.9061$) por lo que los grupos son iguales, al considerar el tratamiento se demostró que no existen diferencias significativas ($p = 0.9219$), al considerar el sexo se demostró que no existen diferencias significativas ($p = 0.4712$); así como interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.8588$). Así el análisis estadístico demuestra que a pesar de la apariencia de mayor cantidad de células en el interior de los folículos linfoides no existen diferencias entre los organismos tratados entre la cantidad de linfocitos y mitosis. Cuadro 4; Gráfica 5 y 6

Cuadro 4

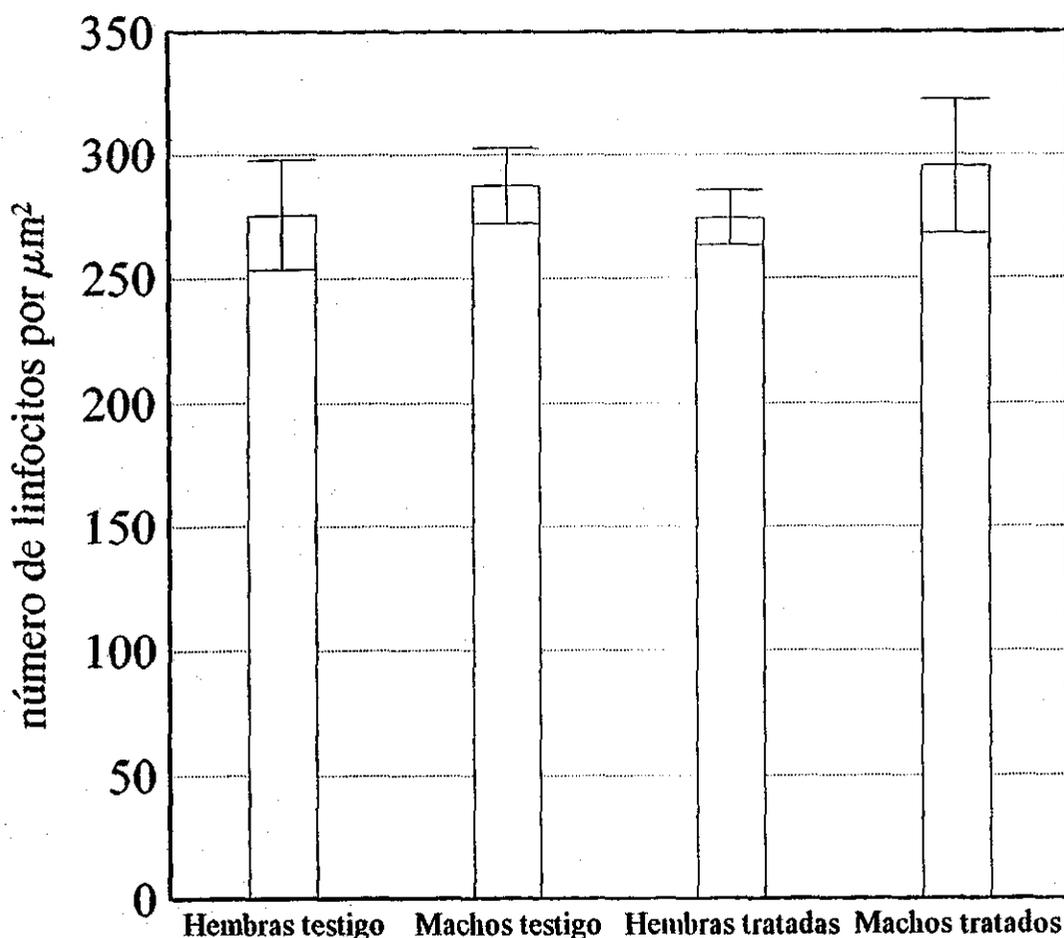
Grupo	Número de linfocitos (μm)	Número de mitosis (μm)
Hembras testigo	275.75 \pm 22.29	8.58 \pm 1.43
Machos testigo	287.56 \pm 15.14	8.00 \pm 1.49
Hembras tratadas	274.56 \pm 11.05	7.22 \pm 1.93
Machos tratados	295.40 \pm 26.93	10.20 \pm 1.86

n = 10 por cada grupo

Las pruebas de *Wilks' Lambda*, *Pillai's trace*, *Hottelling-Lawley Trace* y *Roy's greatest*, que se aplicaron para determinar la proporción de varianza entre el número de linfocitos y mitosis, no mostraron diferencias significativas.

Gráfica 5

Número de linfocitos en los folículos linfoides de la bursa



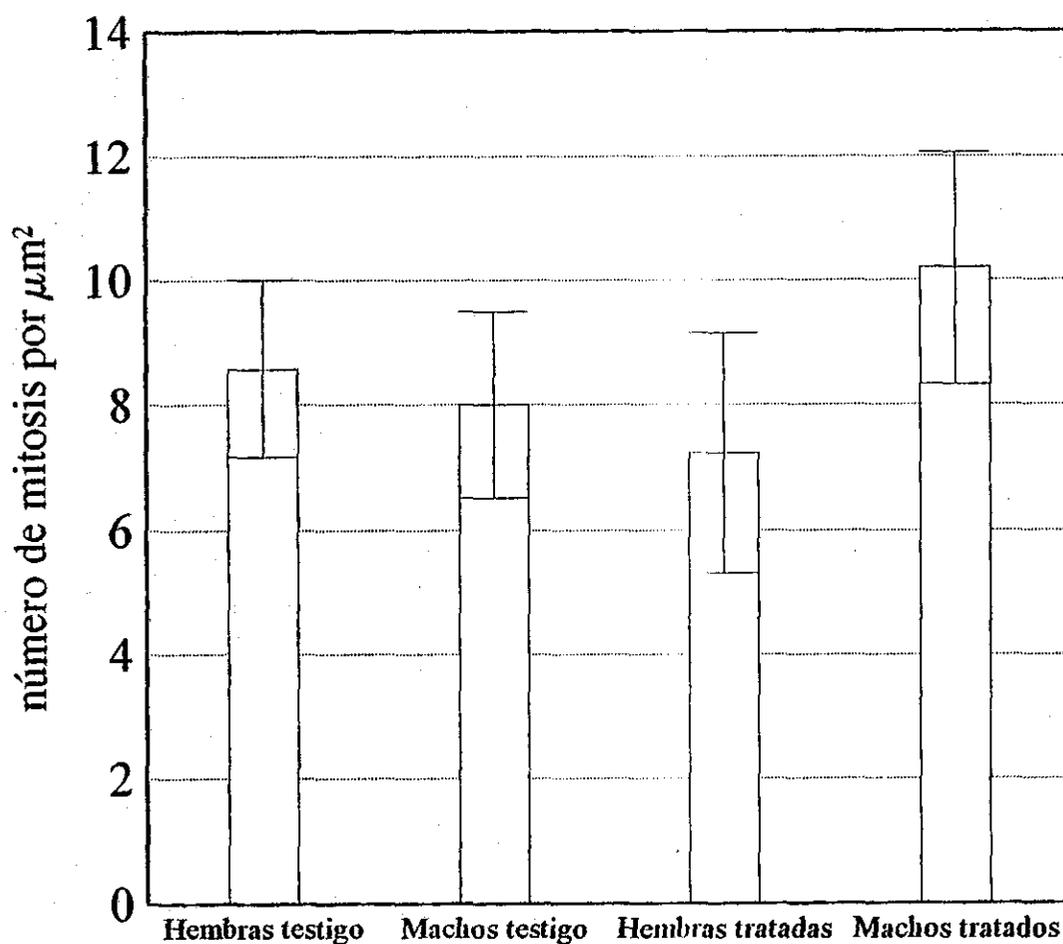
$n = 10$ $p = 0.9452$ área considerada $4505 \mu\text{m}^2$

Los resultados de los análisis de varianza y multivariado se muestran en el cuadro 4

No existen diferencias significativas entre los grupos
Se muestran la medias con sus intervalos de confianza

Gráfica 6

Número de mitosis por folículo linfoide de la bursa



$n = 10$ $p = 0.9061$ área considerada $4505 \mu\text{m}^2$

Los resultados de los análisis de varianza y multivariado se muestran en el cuadro 4

No existen diferencias significativas entre los grupos

Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

Con relación a la densidad numérica de linfocitos se obtuvo que no existen diferencias significativas entre los organismos testigo y tratados con DHEA. Para el número de linfocitos ($p = 0.8747$), al considerar el tratamiento únicamente se obtuvo que no existen diferencias significativas ($p = 0.8749$), al considerar el sexo no existieron diferencias significativas ($p = 0.4414$); de la interacción entre el tratamiento y el sexo en la densidad numérica de linfocitos no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.8306$).

El análisis estadístico aplicado a la densidad numérica de mitosis no mostraron diferencias significativas ($p = 0.6543$) entre los organismos testigo y tratados con DHEA; al considerar el tratamiento con DHEA no existieron diferencias significativas ($p = 0.8048$); al considerar el sexo no se obtuvieron diferencias significativas ($p = 0.4820$) y de la interacción entre el tratamiento y el sexo en la densidad numérica de la mitosis no existen diferencias significativas ($p = 0.2977$). Por lo que podemos concluir que la densidad numérica de linfocitos y mitosis es igual para los animales testigo y tratados con DHEA.

Las pruebas de *Wilks' Lambda*, *Pillai's trace*, *Hottelling-Lawley Trace* y *Roy's greatest*, que se aplicaron para determinar la proporción de varianza entre la densidad numérica de linfocitos y mitosis, no mostraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico del diámetro folicular mayor y menor mostraron que no existen diferencias entre los organismos testigo y tratados con DHEA. Para el diámetro mayor ($p = 0.9543$) el análisis mostró con relación al tratamiento que es igual en los organismos testigo y tratados con DHEA ($p = 0.9509$) así como en relación al

sexo ($p = 0.96140$), no se mostro interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.9005$). El análisis de estadístico para el diámetro menor no mostró diferencias significativas ($p = 0.8539$), con relación al tratamiento mostro que no hay diferencias ($p = 0.8174$) por lo que el diámetro folicular menor es igual en los organismos testigos y tratados con DHEA, con relación al sexo ($p = 0.8903$) no hay diferencias significativas. El análisis mostro que no existe interacción entre el tratamiento y el sexo ($p = 0.9696$) Las pruebas de *Wilks' Lambda*, *Pillai's trace*, *Hottelling-Lawley Trace* y *Roy's greatest*, que se aplicaron para determinar la proporción de varianza entre el diámetro mayor y menor, no mostraron diferencias significativas. Cuadro 5; Gráfica 7

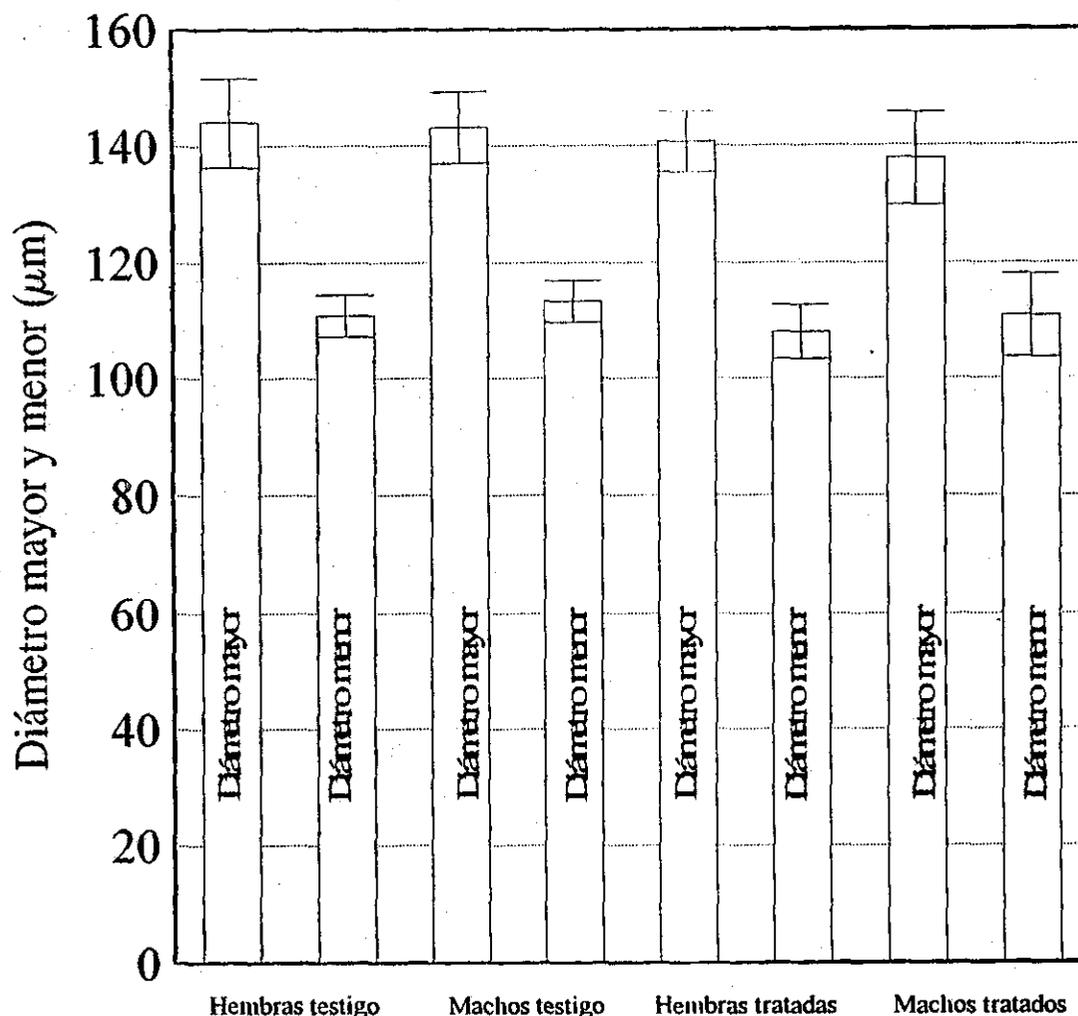
Cuadro 5

Grupo	Diámetro folicular mayor (μm)	Diámetro folicular menor (μm)
Hembras testigo	144.01 \pm 7.62	110.82 \pm 3.66
Machos testigo	143.13 \pm 6.17	113.28 \pm 3.65
Hembras tratadas	140.67 \pm 5.15	107.92 \pm 4.71
Machos tratados	137.79 \pm 7.92	110.77 \pm 7.25

n = 10 para cada grupo

Gráfica 7

Relación del diámetro mayor y menor del folículo linfoide de la bursa



n = 10 diámetro mayor (p = 0.9543) diámetro menor (p = 0.8539)

Los resultados de los análisis de varianza se muestran en el cuadro 2
 No existen diferencias significativas entre los grupos
 Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

El número de células en apoptosis que se presentaron en los folículos linfoides de la bursa de los organismos testigos y tratados fue diferente. El conteo de las células en apoptosis por medio de la técnica de bromuro de etidio mostró que existe una menor cantidad de apoptosis por folículo linfoide en los animales tratados con DHEA (Figuras 19b, 19c, 32a y b), y por lo tanto una disminución en la densidad numérica de las células en apoptosis en los animales tratados con DHEA. El análisis de varianza aplicados al número de apoptosis de los folículos demuestran que existen diferencias significativas ($p = 0.0002$; $F = 9.40$) por lo que la cantidad de células en apoptosis dentro del folículo linfoide es menor en los organismos tratados con DHEA. Cuadro 6; Gráfica 8

Cuadro 6

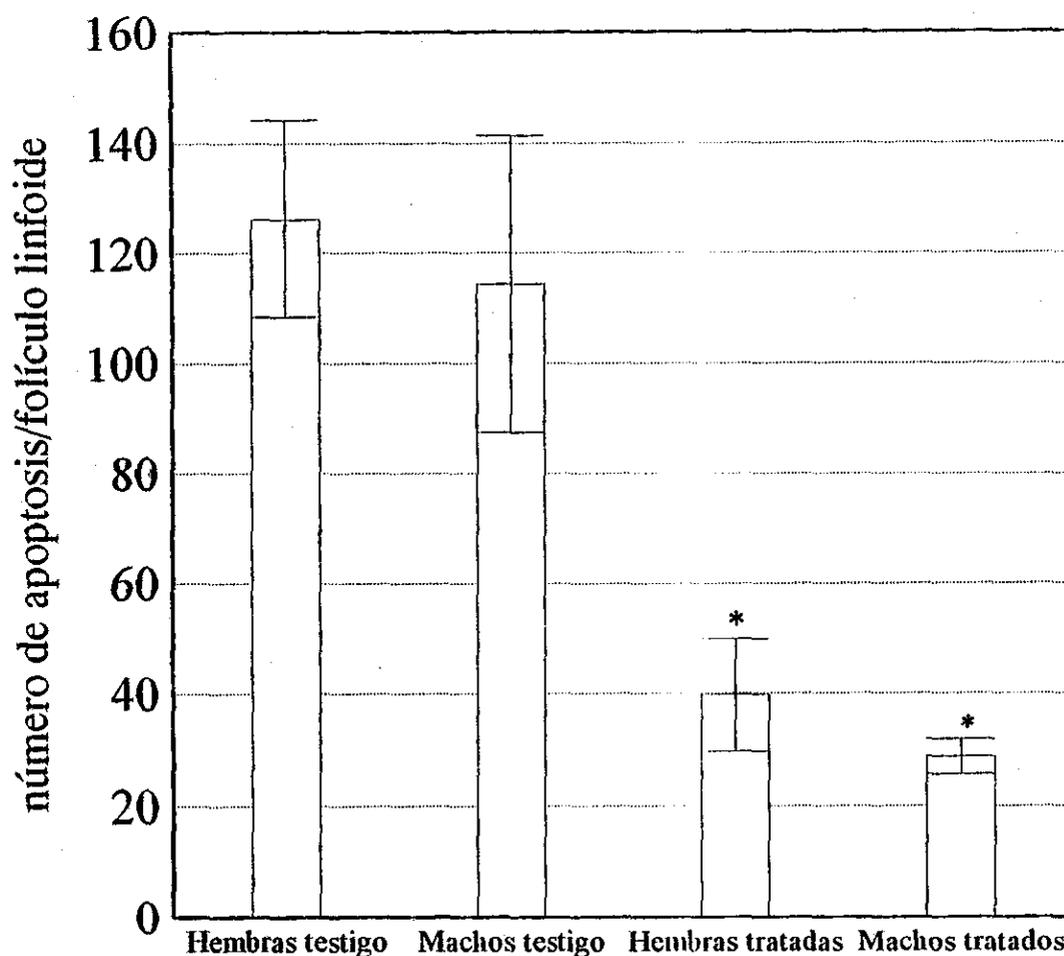
Grupo	Número de apoptosis por folículo (μm)	Densidad numérica de la apoptosis (μm)
Hembras testigo	114.38 \pm 26.98	1.30 \pm 0.198
Machos testigo	126.13 \pm 18.06	1.46 \pm 0.243
Hembras tratadas	28.86 \pm 3.16	0.507 \pm 0.032
Machos tratados	39.40 \pm 9.61	0.598 \pm 0.113

n = 4 por cada grupo

La densidad numérica de la apoptosis en los organismos testigo y tratados con DHEA tuvieron diferencias significativas, con lo que se establece que la apoptosis es menor en los organismos tratados con DHEA ($p = 0.0004$; $F = 8.36$). Esta diferencia, de acuerdo al análisis estadístico, se puede atribuir al tratamiento por DHEA ($p = 0.0001$; $F = 24.53$) por lo que la densidad numérica de células en apoptosis en los folículos linfoides es menor en los organismos tratados con DHEA que en los testigos. Al considerar el sexo se demostró que no existen diferencias significativas ($p = 0.4711$; $F = 0.53$), al considerar la interacción entre el tratamiento y el sexo de la densidad numérica de la apoptosis no se demostró que exista interacción entre ellas ($p = 0.8536$). Por lo que podemos concluir que las diferencias significativas observadas se deben al tratamiento. Gráfica 9

Gráfica 8

Número de células en apoptosis por folículo linfoide en la bursa



n = 8

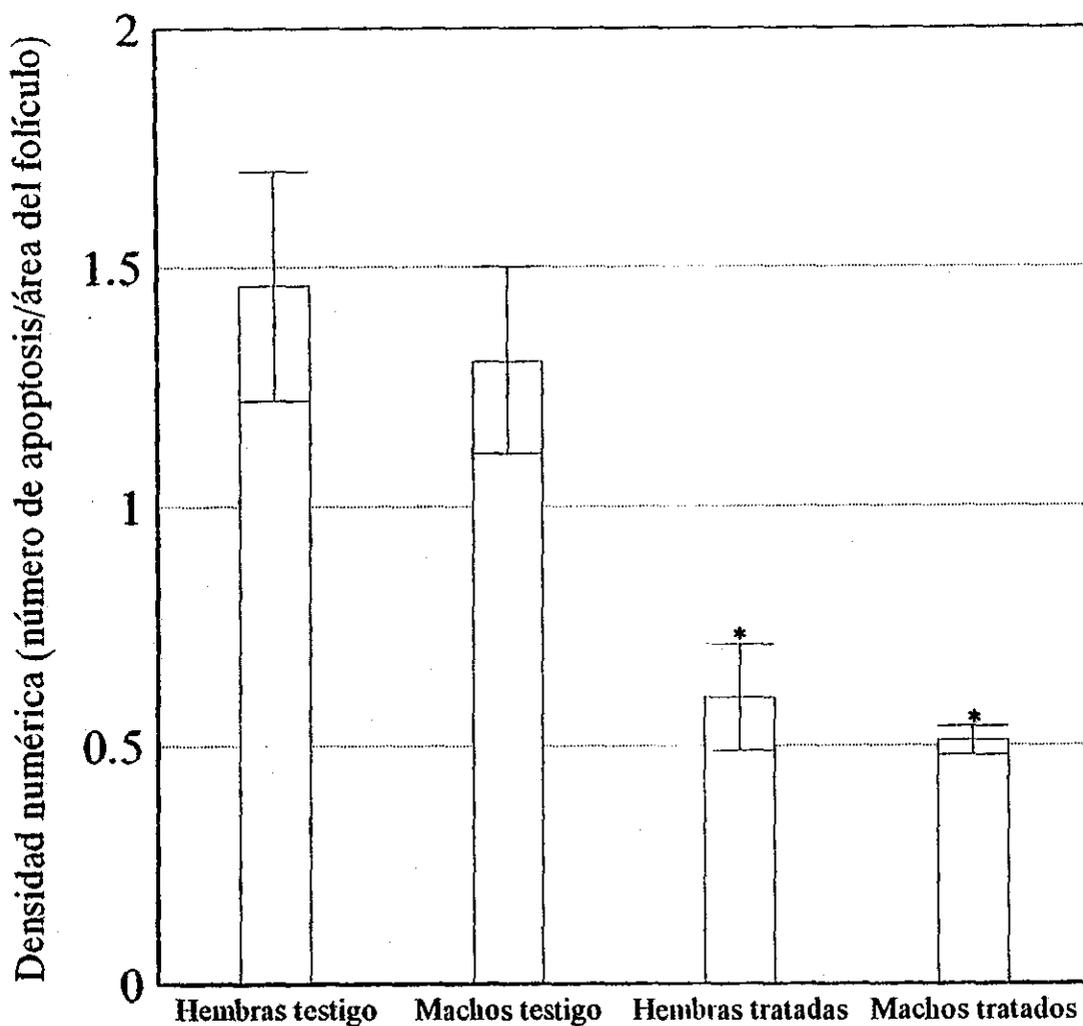
* p = 0.0002

Los resultados del análisis de varianza se muestran en el cuadro 6
Existen diferencias significativas en el número de apoptosis por
folículo linfoide

Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

Gráfica 9

Número de células en apoptosis por el área folicular



n = 8

* p = 0.0001

Los resultados del análisis de varianza se muestran en el cuadro 6
 Existen diferencias significativas en la densidad numérica de la apoptosis
 Se muestran las medias con sus intervalos de confianza

Los resultados de la densidad numérica para las células Tap-1⁺ demostraron que no existen diferencias significativas entre los animales testigo y tratados con DHEA. El resultado de la prueba de T aplicada a la densidad numérica de las células Tap-1⁺ (Ia⁺), fue que no existen diferencias significativas entre los grupos (T = 1.64; p= 0.175). Cuadro 7

Cuadro 7

Grupo	Células Tap 1 ⁺ (Ia ⁺)
Machos testigo	0.159 ± 0.045
Machos tratados	0.115 ± 0.0087

n = 3 para todos los grupos

VI 4. Estudios de captación de tinta china

La presencia de tinta china en las células FAE fue más evidente en las células de los botones epiteliales de los animales tratados (Figuras 33). Los resultados del análisis estadístico con una χ^2 aplicado al número de organismos que captaron la tinta china en los botones de células FAE, demostraron que en el grupo de los animales tratados con DHEA hubo una mayor captación de tinta china (80 por ciento) que en los animales testigos (59 por ciento), por lo que existen diferencias significativas en la captación de tinta china por la bursa de los animales tratados con DHEA (p <0.05) Cuadro 8.

Cuadro 8

Grupo	Células FAE con tinta china		Células FAE sin tinta china	
Testigo	23/39	59%	16/39	41%
Tratados	33/41	80%	8/41	20%

n = 40 para cada grupo

Se muestran los porcentajes obtenidos entre los animales testigos y tratados, al inyectarse tinta china por la cloaca. De la Prueba de χ^2 se obtuvo una χ^2 calculada = 4.4049; χ^2 de tablas = 3.8416; $p < 0.05$. Por lo que los animales tratados con DHEA tienen un mayor porcentaje de animales que fagocitan tinta china en el tiempo de tres horas. Con lo que se demuestra existen diferencias significativas en la cantidad de animales que atraparon la tinta china por bursa. Cuadro 8.

Cuadro 9

Grupo	Absorvancia
Hembras testigo	0.0719 ± 0.0032
Machos testigo	0.0916 ± 0.0053
Hembras tratadas	0.0963 ± 0.00058
Machos tratados	0.1229 ± 0.0134

n = 5 para cada grupo

Del análisis de varianza aplicado a los datos obtenidos de las lecturas por densitometría (absorbancia) se demostró que no existen diferencias significativas en la cantidad de tinta china contenida en el interior de los botones de células FAE ($p = 0.2940$; $F = 1.37$), por lo que la cantidad de tinta fagocitada por estas es semejante en los animales testigo y los animales tratados con DHEA. Al considerar el tratamiento no existen diferencias significativas entre los organismos testigo y tratados con DHEA ($p = 0.1415$; $F = 2.43$). Al considerar el sexo no existen diferencias significativas ($p = 0.1512$; $F = 2.30$); en la interacción entre el tratamiento y el sexo no existe relación entre estas ($p = 0.0862$; $F = 3.41$). Cuadro 9.

VII. Discusión

Nuestros resultados demuestran que la DHEA ejerce un efecto sobre la bursa de Fabricio, manifestado por un aumento del área de las células FAE, una mayor proporción de fagocitosis de tinta china por las células FAE, y una disminución de la apoptosis sufrida por los linfocitos B. Se observan cambios en el arreglo de algunos de los elementos que constituyen el folículo linfoide.

Los resultados obtenidos del estudio bioquímico de la concentración de ADN y proteínas y su relación con el peso húmedo de la bursa, no mostraron diferencias significativas. Sin

n = 5 para cada grupo

Del análisis de varianza aplicado a los datos obtenidos de las lecturas por densitometría (absorbancia) se demostró que no existen diferencias significativas en la cantidad de tinta china contenida en el interior de los botones de células FAE ($p = 0.2940$; $F = 1.37$), por lo que la cantidad de tinta fagocitada por estas es semejante en los animales testigo y los animales tratados con DHEA. Al considerar el tratamiento no existen diferencias significativas entre los organismos testigo y tratados con DHEA ($p = 0.1415$; $F = 2.43$). Al considerar el sexo no existen diferencias significativas ($p = 0.1512$; $F = 2.30$); en la interacción entre el tratamiento y el sexo no existe relación entre estas ($p = 0.0862$; $F = 3.41$). Cuadro 9.

VII. Discusión

Nuestros resultados demuestran que la DHEA ejerce un efecto sobre la bursa de Fabricio, manifestado por un aumento del área de las células FAE, una mayor proporción de fagocitosis de tinta china por las células FAE, y una disminución de la apoptosis sufrida por los linfocitos B. Se observan cambios en el arreglo de algunos de los elementos que constituyen el folículo linfoide.

Los resultados obtenidos del estudio bioquímico de la concentración de ADN y proteínas y su relación con el peso húmedo de la bursa, no mostraron diferencias significativas. Sin

embargo el que no se presenten cambios en estos parámetros no necesariamente indica que la DHEA carece de efecto sobre la bursa de Fabricio. Lo que es evidente es que la administración de este esteroide no muestra el mismo efecto que los glucocorticoides suprarrenales, los que inciden de manera notoria sobre la densidad celular del tejido linfoide (Glick, 1984; Santisteban, 1960), provocando, además, la apoptosis de los linfocitos B de la bursa (Compton *et al.*, 1990; Evans-Storms y Cidlowski, 1995; Motyka, *et al.*, 1995). Tampoco muestra el efecto demostrado para el 19-nortestosterona o el propionato de testosterona, los que producen la inhibición parcial o total de la bursa y por lo tanto una inmunodeficiencia profunda en las aves (Szenberg, 1976; Gasc y Stumpf, 1981; Weill *et al.*, 1987; McCormack y Thompson, 1990).

La estructura del folículo linfoide de la bursa de Fabricio de los animales tratados con DHEA, muestra que existe un efecto que se manifiesta por crecimiento de las células FAE, por mayor dendricidad en las células dendríticas secretoras (Ia^+), por la mejor definición de la corteza en el folículo linfoide y por la presencia de estructuras semejantes al corpúsculo de *Hassall*.

Los cambios estructurales observados en los animales tratados con DHEA apuntan a una estructura histológica más semejante a la de animales de cuatro semanas de edad y no de recién nacidos (Romppanen, 1982; Oláh y Glick, 1987). Otra característica morfológica que permite argumentar en favor de una apariencia más madura en los folículos bursales de los organismos tratados, es la disminución de los heterófilos entre los folículos linfoides,

pues la presencia de granulopoyesis es una característica del período embrionario (Shiojiri y Takahashi, 1991; Houssaint *et al.*, 1976).

El crecimiento de la región medular y cortical de los folículos linfoides tiene un patrón alométrico, creciendo a una velocidad mayor la corteza. La razón de esta diferencia es poco clara y se ha interpretado como una actividad funcional diferente para cada uno de estos compartimentos (Romppanen, 1982; Betti *et al.*, 1991). En los animales tratados, la DHEA parece favorecer la presencia de una corteza mejor definida y la formación de estructuras semejantes a un corpúsculo tímico o de *Hassall* en la porción central de la médula folicular. La presencia de esta estructura también se ha considerado relacionada estrechamente con una maduración del folículo linfoide (Naukkarinen *et al.*, 1978; Oláh y Glick, 1992a).

El que el área de las células FAE sea mayor que la de los animales testigo es muy importante, pues se ha propuesto que estas células están involucradas en la organización del folículo linfoide durante el desarrollo embrionario (Lupetti *et al.*, 1990), así como en el restablecimiento del folículo después del tratamiento con testosterona (Lupetti *et al.*, 1984). Se ha demostrado además que las células FAE presentan características muy similares a la de los macrófagos, ya que son esterasa inespecífica positivas, presentan capacidad de fagocitosis, son sensibles a la carragenina y a la sílica (Lupetti y Dolfi, 1980; Dolfi *et al.*, 1981; Lupetti *et al.*, 1983a; Lupetti *et al.*, 1983b; Lupetti *et al.*, 1984). El que estas células, con todos estos atributos, sean afectadas por el tratamiento, nos permite

especular sobre la importancia que tendrían en la maduración de los linfocitos B. Hay analogías entre las células FAE y las células M (Oláh y Glick, 1992a), que son células especializadas de los epitelios simples que transportan antígenos (macromoléculas, partículas y microorganismos) a través del epitelio hasta el tejido linfoide asociado a la mucosa, para iniciar la respuesta inmunológica de los linfocitos (Owen y Ermak, 1990; Neutra *et al.*, 1996; Gebert *et al.*, 1996). Las placas de Peyer que se han homologado funcionalmente con la bursa de Fabricio, presentan células M (Griebel y Hein, 1996). En diferentes especies se ha probado que durante el desarrollo embrionario la presencia de antígenos no influye en el desarrollo de las placas de Peyer. Sin embargo, la ausencia postnatal de antígenos sí influye en la estimulación del desarrollo de las placas de Peyer y por lo tanto en la producción de anticuerpos (Reynaud *et al.*, 1994; Griebel y Hein, 1996). En el caso de la bursa, las células FAE están en posibilidad de fagocitar antígenos del medio ambiente y se ha propuesto que los mecanismos de succión que tienen los labios de la cloaca, sean la forma eficaz de tomar antígenos externos y promover la síntesis de anticuerpos (Schaffner *et al.*, 1974; Sorvari *et al.*, 1975; Sorvari y Sorvari 1977; Gilmore y Bridges, 1977; Ekino *et al.*, 1985). De hecho, existe la propuesta de que los antígenos tomados del medio ambiente juegan un papel importante en el desarrollo de los linfocitos B, ya que se ha demostrado que la administración de bacterias por la cloaca favorece respuestas de aglutinación más rápidas, que en animales a los que no se ha expuesto al antígeno (Sorvari *et al.*, 1975; Sorvari y Sorvari 1977; Ekino *et al.*, 1985; Ekino, 1993; Ekino *et al.*, 1995). Esto relacionado además con la propuesta de que la diversificación del repertorio de anticuerpos es antígeno dependiente (Van Alten y Meuwissen, 1972; Ekino *et al.*, 1985; Ekino, 1993; Ekino *et al.*, 1995). La respuesta obtenida al estimular con la

inoculación de *Bordetella pertussis* por la cloaca, ha demostrado que existe un aumento en el peso relativo de la bursa, aumento en el índice mitótico de los linfocitos y aumento en el volumen de la médula folicular (DeAzebedo y Betti, 1993). Considerando que los cambios observados en la estructura del folículo linfoide de animales inoculados con bacterias por la cloaca, los que son muy evidentes, es muy probable que en el caso de los animales tratados con DHEA no muestren estos incrementos en todos los elementos constitutivos del folículo, debido a que no existe, además del tratamiento hormonal, un estímulo antigénico que active a los linfocitos y la formación de anticuerpos. Se ha planteado que para que la DHEA tenga un efecto inmunomodulador se requiere que exista un estímulo antigénico, pues se ha visto que la DHEA tiene efecto inmunoprotector cuando le antecede un estímulo antigénico o infeccioso (Loria *et al.*, 1988; Regelson *et al.*, 1994) por lo que podemos suponer que la DHEA requiere de la presencia de infecciones o *stress* para que se muestre su efecto inmunomodulador (Araneo *et al.*, 1995; Araneo y Daynes 1995).

Como ya mencionamos anteriormente, las células FAE comparten características con los macrófagos y Hennebold y Daynes (1994), describen que los macrófagos presentan la DHEA sulfatasa, que les permite desulfatar a la DHEAS y transformarla a DHEA. Estos investigadores proponen que la participación de la DHEA sulfatasa represente un mecanismo regulatorio importante en la función de los macrófagos, el cual puede ser regulado por citocinas. Según Lupetti y colaboradores (1990) las células FAE son de origen mesenquimatoso, y considerando su equivalencia funcional con los macrófagos, cuyo funcionamiento es bien sabido puede ser regulado por hormonas esteroides (Miller y

Hunt, 1996), y el que se presente un efecto en las células FAE por la DHEA es coincidente y reafirma dicha equivalencia funcional.

El incremento del área y la mayor capacidad de fagocitosis de las células FAE de las bursa de los animales tratados con DHEA, resulta muy importante ya que existe información en la que se establece que la formación de anticuerpos por las células B es dependiente de antígenos (Ekino *et al.*, 1979; Ekino *et al.*, 1985). Estos cambios en las células FAE pueden tener relación en la secuencia de eventos que siguen a la fagocitosis de antígenos del medio ambiente cloacal los cuales son cedidos a las células dendríticas secretoras, que son células Ia^+ , y que funcionan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos B para que sinteticen anticuerpos (Naukarinnen y Sorvari, 1984; Schaffner *et al.*, 1974; Sorvari *et al.*, 1975). Sin embargo, cabe señalar que existe información en la que se demuestra que la formación de anticuerpos no es dependiente de antígenos (Lupetti y Dolfi, 1980).

Durante la ontogenia de la bursa de Fabricio se ha descrito la migración de dos estirpes celulares, las células Ia^+ y las células $sIgM^+$. Las células Ia^+/IgM^- aparecen primero en la bursa en el día 9 (Ewert *et al.*, 1984; Houssaint *et al.*, 1987; Houssaint, 1987), y podrían tener relación con la presencia de células mesenquimatosas oscuras entre el día 9 y 10 del desarrollo embrionario, que inducen la formación del botón epitelial (Glick y Oláh 1993a y b; Glick, 1995), y posteriormente originan a las células dendríticas secretoras (Glick y Oláh, 1993a; Glick y Oláh, 1993b; Glick 1995; Gallego *et al.*, 1996), las cuales tienen una

participación activa en el mantenimiento y desarrollo de los linfocitos B (Eerola *et al.*, 1982; Glick, 1995), a través de una posible función endocrina (Oláh y Glick, 1987; Glick y Oláh, 1993a; Glick y Oláh, 1993b). Por ser vimentina positivas e Ia⁺, Oláh y Glick, (1987) han propuesto que las SDC son similares a las células de Langerhans de los mamíferos. Además, por medio de anticuerpos monoclonales se ha sugerido que las células dendríticas secretoras bursales (BSDC), participen en la presentación de antígenos (Moriya y Ichikawa, 1979). Con relación al aumento de dendricidad de las células dendríticas secretoras (Ia⁺) de los organismos tratados, es muy probable que esté vinculado con los cambios observados en las células FAE, ya que estas células dendríticas secretoras, presentan las características de las células presentadoras de antígenos (Oláh y Glick, 1987). Existen informes en los que el tratamiento con DHEAS aumenta la respuesta de los centros germinales de ratones viejos (Caffrey *et al.*, 1994) y se piensa que es a través de las células dendríticas foliculares, las cuales actúan como células atrapadoras de antígenos. Lo que hace muy probable que las células dendríticas secretoras puedan responder al estímulo de la DHEA, al tener funciones de células presentadoras de antígenos (Oláh y Glick, 1987).

Otros datos que pueden relacionarse con los cambios observados en las células SDC es el hecho de que se ha demostrado que la dexametasona actúa como un inmunosupresor *in vitro* e *in vivo* afectando la viabilidad de estas células, sobre todo en su capacidad de expresar moléculas de características inmunoestimuladoras, así como en su capacidad de presentar antígenos, afectando por lo tanto la función de activación de los linfocitos T (Moser *et al.*, 1995). Contrariamente, se ha demostrado que la administración de DHEA,

posteriormente a los glucocorticoides tiene un efecto antagónico a éstos (Daynes *et al.*, 1990a y b; Blauer *et al.*, 1991; Regelson *et al.*, 1994; Regelson y Kalimi, 1994).

Se ha visto que las hormonas esteroides participan en la regulación del sistema inmune, sobre todo porque los glucocorticoides están involucrados en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (Compton *et al.*, 1990; Evans-Storms y Cidlowski, 1995; Motyka, *et al.*, 1995). El papel de la muerte celular y los mecanismos involucrados en ésta, aun no son del todo claro en el sistema inmunológico (Cohen, 1991; Osborne, 1995). Está demostrado que alrededor del 90 al 95 por ciento de los linfocitos de la bursa y en las placas de Peyer mueren por apoptosis y que sólo un 5 por ciento de los linfocitos producidos se diferencian y migran (Motyka *et al.*, 1995; Griebel y Hein, 1996). Se piensa que la apoptosis que se presenta en la bursa puede deberse a una falta del micro ambiente requerido para el desarrollo de los linfocitos B y a la pérdida de la expresión de la inmunoglobulina Ig en la superficie de los linfocitos B (Paramithiotis *et al.*, 1995). Estudios realizados por Neiman y colaboradores (1991; 1994) señalan que el índice de células apoptóticas aumenta cuando los linfocitos son disgregados y por lo tanto se evita el contacto célula-célula, lo que se puede relacionar con observaciones realizadas en las que se plantea que la interrelación del micro ambiente bursal (Houssaint, *et al.*, 1976; Ratcliffe, 1985; Boyd y Ward, 1984; Boyd *et al.*, 1990), en específico las células dendríticas secretoras (Ia^+), son las responsables de crear un micro ambiente adecuado para el desarrollo de los linfocitos B (Boyd y Ward, 1984; Oláh y Glick, 1987; Glick y Oláh, 1993a; Glick y Oláh, 1993b).

Los resultados con relación a la apoptosis muestran que existe una reducción de la apoptosis en los animales tratados, lo que demuestra un efecto de la DHEA y o sus metabolitos sobre la bursa de Fabricio. Esta reducción en la apoptosis puede relacionarse con la presencia de una mayor dendricidad de las células dendríticas secretoras (Ia^+), en los animales tratados que incluso ya no muestran el patrón de distribución corticomedular, sino que se encuentran ya dispersas por toda la médula folicular, lo que es una característica de la bursa de Fabricio de organismos de edades más avanzadas (Oláh y Glick, 1987). Si efectivamente estas células son las responsables de crear un micro ambiente adecuado para la proliferación y diversificación de los linfocitos B, es claro que tenemos un efecto sobre el mecanismo de selección negativa, lo que propicia el desarrollo de los linfocitos B al verse reducida la apoptosis.

En la formación de los linfocitos B existen dos mecanismos de selección, uno denominado selección negativa, por medio del cual se eliminan los linfocitos que presenten alteraciones en la información para la síntesis de inmunoglobulinas y como consecuencia, se piensa que los linfocitos muestran un defecto en los antígenos de superficie de las clonas que se están formando y por lo tanto se de la apoptosis. El otro mecanismo es la selección positiva, en la cual los linfocitos son favorecidos a permanecer y proliferar, se piensa es porque expresan de manera adecuada los antígenos de superficie (Nossal, 1994; vonBoehmer, 1994; Alberola-Ila *et al.*, 1996). La expresión de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se lleva a cabo a los nueve días en el embrión de pollo, las inmunoglobulinas superficiales se expresan más tardíamente, en el día 12, y las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se expresan hasta el

día 17 (Hoshi *et al.*, 1988; Hemendinger *et al.*, 1992). La interacción del receptor de células T (TCR) con sus ligandos (moléculas del MHC ligados a péptidos), es un factor fundamental en la diferenciación de las células T, de tal manera que el grado de afinidad entre dichas moléculas es la base de la selección positiva y de la selección negativa (Alberola-Ila *et al.*, 1996). Estas observaciones en cuanto a la aparición de moléculas de superficie y su relación con el tipo de selección que pueden experimentar los linfocitos, permiten considerar que los resultados en relación a la apoptosis y al arreglo de los elementos constitutivos del folículo linfoide pueden estar asociados.

Otra posible explicación del por qué se dá la reducción de la apoptosis en los organismos tratados con DHEA, es un posible desequilibrio en el mecanismo de selección negativa y positiva, dando como resultado la presencia de células que deberían sufrir apoptosis, pero que no la sufren, porque el proceso de reconocimiento de los antígenos de superficie es inadecuada y por lo tanto las células se activan dando como resultado su permanencia (Funk y Thompson, 1996; Sarthou *et al.*, 1996; Jacobsen *et al.*, 1996). El que no se eliminen los linfocitos B por el mecanismo de apoptosis puede provocar la presencia de células B autoreactivas (Ashman *et al.*, 1996; Sarthou *et al.*, 1996; Jacobsen *et al.*, 1996).

Las alteraciones provocadas por diversos esteroides durante el desarrollo embrionario, en términos generales, indican que el efecto inhibe el desarrollo de la bursa de Fabricio (Meyer *et al.*, 1959; Aspinall *et al.*, 1961; Dieter y Breitenbach, 1970; Szenberg, 1976; ; Norton y Wira, 1977; Gasc y Stumpf, 1981; Lupetti *et al.*, 1983; Glick, 1984; Verheul *et al.*, 1986). Sin embargo, existe el antecedente por Norton y Wira (1977) de cómo el efecto está

estrechamente relacionado con la dosis, pues encuentran que dosis por debajo de las concentraciones endógenas de propionato de testosterona y progesterona aumentan el crecimiento de la bursa y promueven una síntesis mayor de inmunoglobulinas. Por lo anterior, plantean que los esteroides endógenos jueguen un papel importante en el desarrollo fisiológico de la bursa. Esto es muy importante a la luz de ésta investigación porque la dosis empleada es una dosis fisiológica, lo cual podría ser una explicación del resultado observado de estimulación en la apariencia morfológica del folículo linfoide.

Desde hace tiempo se ha confirmado la presencia de receptores a esteroides en células semejantes a fibroblastos, en linfocitos y en células del epitelio superficial de la bursa. (Schaumburg y Crone, 1971; Sullivan y Wira, 1979; Gasc y Stumpf, 1981; Ylikomi *et al.*, 1985; 1987a; 1987b; 1989; Compton *et al.*, 1990). La presencia de receptores a progesterona en células de la bursa, puede tener el advenimiento de la madurez sexual en los pollos, pues se ha demostrado que la administración de estradiol en etapas previas a la madurez sexual induce la aparición de receptores a progesterona. Se ha observado, además, que las hembras son más susceptibles al tratamiento con estradiol y presentan mayor cantidad de receptores a progesterona en células semejantes a fibroblastos, células musculares lisas y células estromales del folículo linfoide que se localizan por debajo del epitelio de revestimiento (Ylikomi *et al.*, 1985; 1987a; 1987b; 1989). Con nuestros resultados podemos considerar que la DHEA tal vez sea metabolizada o transformada a otro tipo de esteroide. Sin embargo, esto resulta poco probable ya que existe la evidencia de que la DHEA no es metabolizada por la bursa de Fabricio (Bedrak *et al.*, 1971; Aspinall *et al.*, 1961).

Recientemente se ha descrito la presencia de un receptor específico para la DHEA en células T de ratón y en células de hígado de rata (Kalimi y Regelson, 1988; Meikle *et al.*, 1992); estos hallazgos se han confirmado en linfocitos T de humano, en los cuales se ha observado que existe una alta afinidad específica por DHEA marcada y además, esta unión se incrementa cuando las células T están activadas, por lo que se piensa que la DHEA pueda regular la actividad de los linfocitos T activados (Okabe *et al.*, 1995). Esto relacionándolo con lo observado en macrófagos, los cuales pueden ser regulados en su funcionamiento por esteroides (Miller y Hunt, 1996) y presentan la enzima para desulfatar a la DHEAS (Hennebold y Daynes, 1994), abre la posibilidad de la existencia de un receptor para DHEA en algunas de las células que tienen equivalencia funcional con los macrófagos en bursa.

Resulta interesante comentar que el efecto que se observa en la bursa podría ser mediado por los macrófagos, los cuales se ha demostrado tienen la capacidad de desulfatar la DHEAS (Hennebold y Daynes, 1994) en asociación con la presencia de linfocitos T, que se encuentran en pared dorsal del conducto cloacal (Cortés *et al.*, 1995; Khan y Hashimoto, 1996), pues el efecto inmunoregulator de la DHEA se ha observado en linfocitos T (Daynes *et al.*, 1990a y b; Kim *et al.*, 1995), por lo que tal vez el efecto observado en la bursa este siendo mediado por la zona de infiltrado linfoide que contiene los linfocitos T, provocando que estos liberen sustancias que promuevan el desarrollo de los linfocitos B.

El papel de la DHEA sobre el sistema inmunológico últimamente se ha visto bien documentada (Daynes *et al.*, 1990a y b; Blauer *et al.*, 1991; Regelson *et al.*, 1994;

Regelson y Kalimi, 1994; Daynes *et al.*, 1995). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que metabolitos de la DHEA como el androstenediol y androstenetriol son aún más potentes que ésta (Padget y Loria, 1994; Loria *et al.*, 1996).

Por lo anterior, el presente trabajo sobre el efecto de la DHEA en la bursa de Fabricio, abre varias posibilidades de estudios posteriores, ya que muestra que efectivamente existe un efecto, pero no se aclara si es *per se* o a través de alguno de sus metabolitos, no se sabe si el efecto es a través de un receptor específico, o sea a través de un receptor para otro esteroide o incluso si es que la DHEA esté mediando la aparición de receptores para esteroides.

Los resultados de éste trabajo muestran un efecto biológico de la DHEA por lo menos sobre una de las poblaciones funcionales de la bursa. La importancia de esta acción sobre la función inmunológica de las aves será motivo de futuros estudios.

VIII. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos muestran que la DHEA administrada en dosis fisiológicas y de manera sostenida durante el desarrollo embrionario provoca:

- 1.- Aumento en el área de las células epiteliales asociadas al folículo.
- 2.- Una mayor dendricidad de las células dendríticas secretoras.
- 3.- Una disminución en la apoptosis de los folículos en los organismos tratados.
- 4.- Un incremento en la captación de tinta china por bursa mostrado en las células FAE.

De las observaciones cualitativas se obtuvo que:

- 1.- Existe una disminución en la presencia de heterófilos
- 2.- Se observa una mejor definición de la corteza y de la médula
- 3.- Se observa la presencia de corpúsculos tímicos o de *Hassall*

Este trabajo establece bases para posteriores estudios en los que se puede valorar la interrelación inmunoendocrina, así como la posibilidad de poder esclarecer cómo es que la DHEA participa en la regulación de la respuesta inmune.

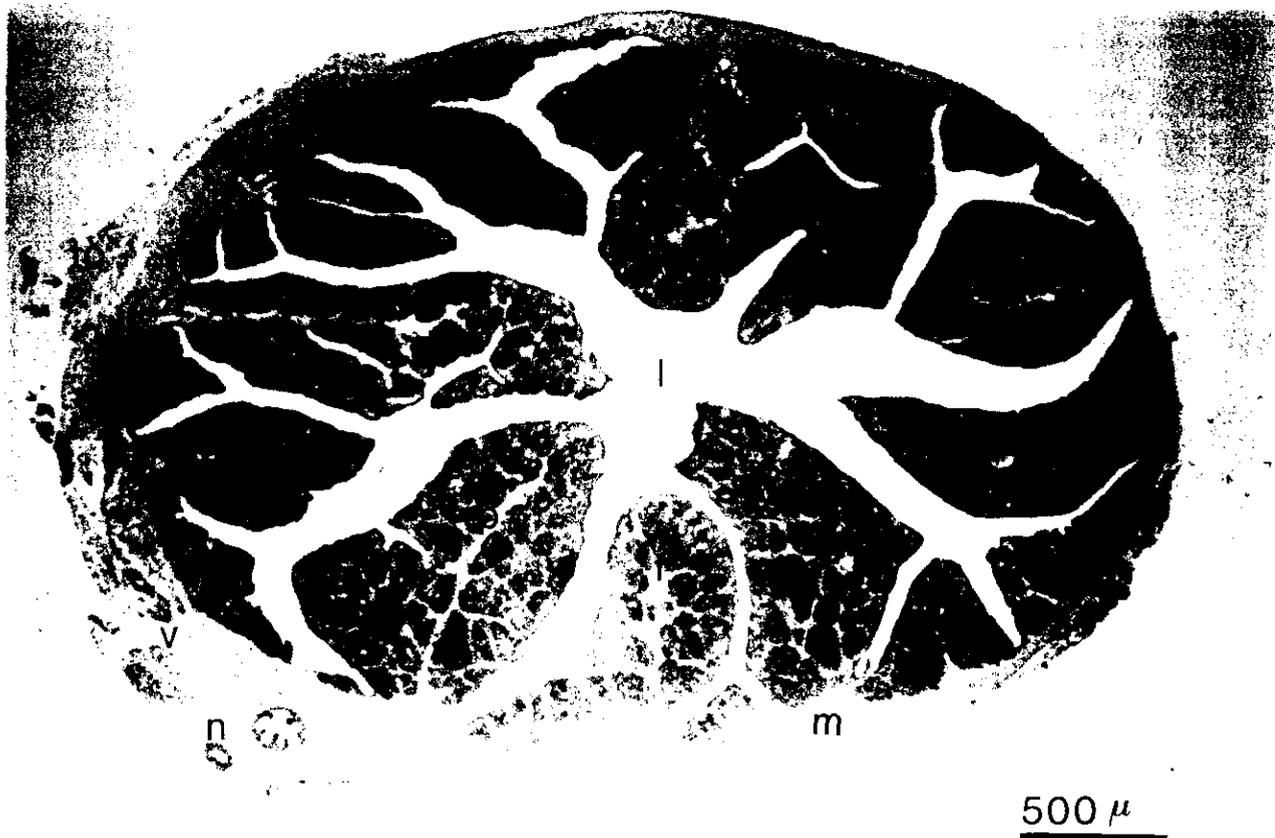
IX. Fotomicrografias

Figura 16a. Corte transversal de bursa de Fabricius de hembra tratada. Se observan las cuatro capas que constituyen este órgano linfóide. En la parte más externa está presente una capa serosa constituida por tejido conjuntivo (tc), que tiene adherido algo de tejido conjuntivo laxo, que está acompañado de vasos sanguíneos (v) y nervios (n), posteriormente se encuentra una capa de tejido muscular (m). Las plicas de la bursa (p) se proyectan hacia el interior de la luz del órgano (l), en plicas se distinguen los folículos linfoides (f), que se observan como estructuras esféricas a ovoides. Tricrómica de Masson. 31.25X.

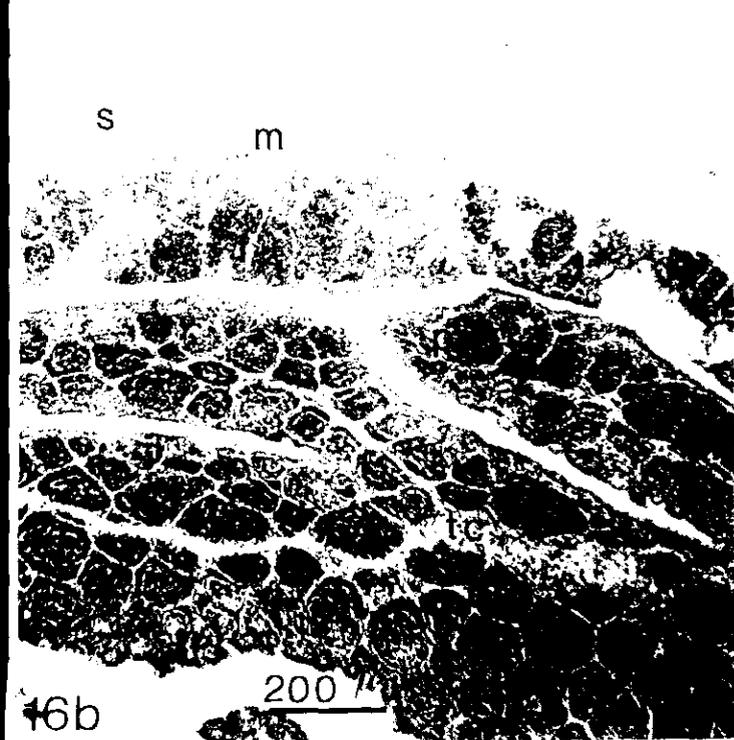
Figura 16b. Corte transversal de bursa de Fabricio de hembra testigo. Se observan la capa serosa (s), la capa muscular (m) que tiene fibras que corren en sentido longitudinal y en sentido circular. Las plicas (p) se proyectan hacia el interior de la luz. En el interior de las plicas se encuentran los folículos linfoides (f) y tejido conjuntivo (tc). Tricrómica de Masson 62.5X.

Figura 16c. Corte transversal de bursa de Fabricio de hembra tratada. Se observan la capa serosa de la bursa (s), la capa muscular (m) que tiene fibras que corren en sentido longitudinal y en sentido circular. Las plicas (p) se proyectan hacia el interior de la luz. En el interior de las plicas se encuentran los folículos linfoides (f) y tejido conjuntivo (tc). Tricrómica de Masson 62.5X.

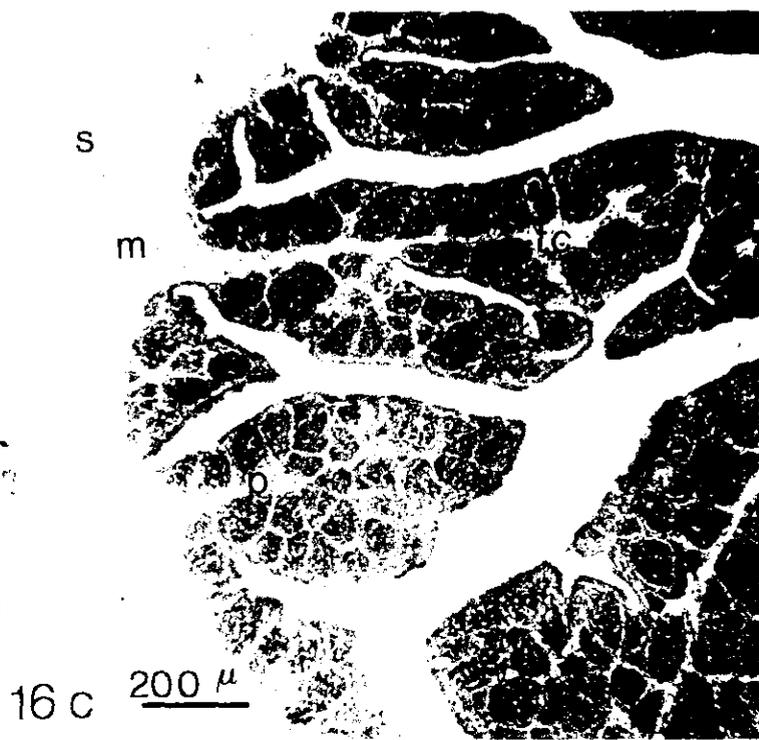
-



16 a



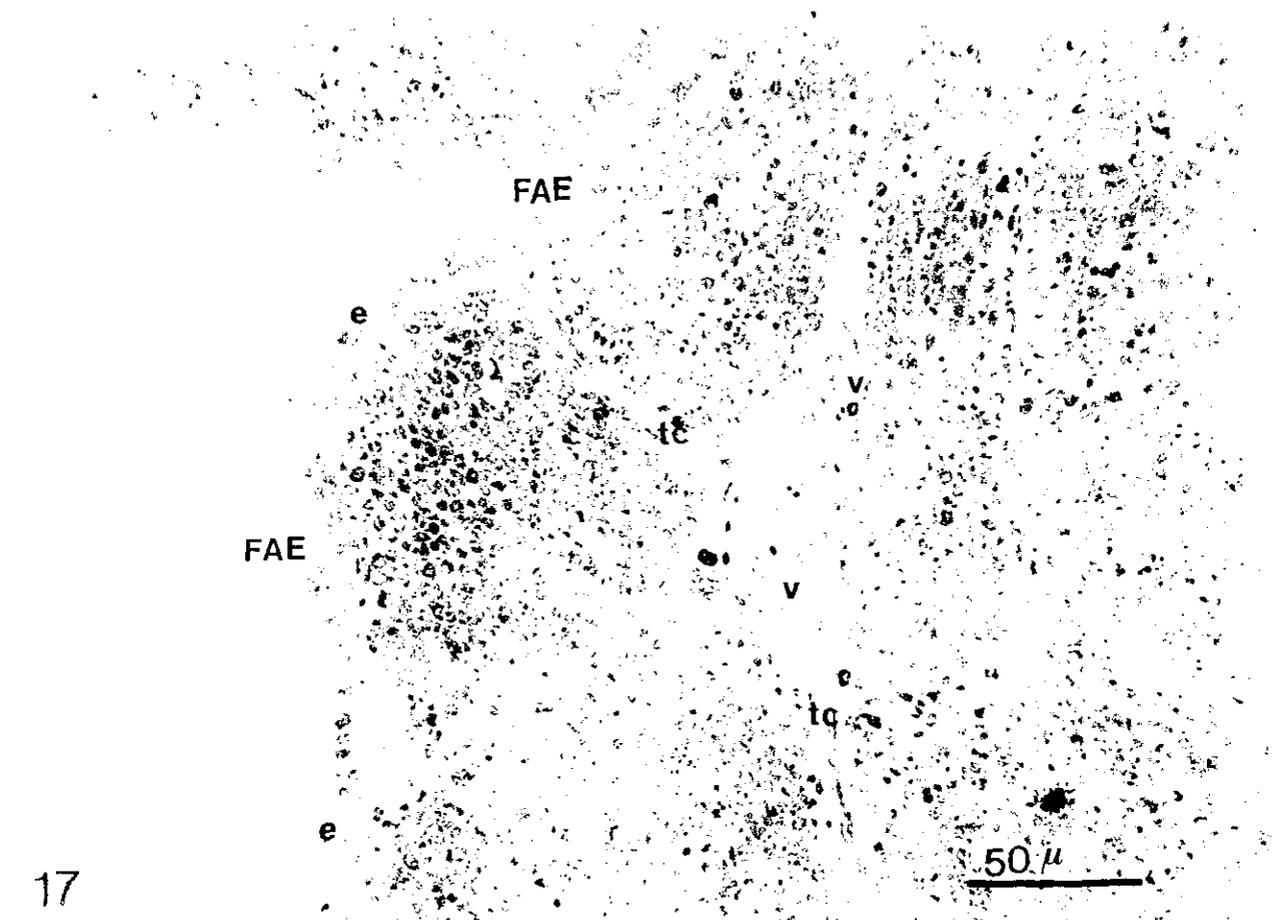
16 b



16 c

Figura 17. Plica que muestra varios folículos linfoides de macho tratado. El epitelio de revestimiento de la plica está constituido por epitelio cilíndrico pseudoestratificado secretor (e), el cual, es interrumpido por la presencia de células epiteliales asociadas al folículo (FAE). Los folículos linfoides están delimitados por tejido conjuntivo (tc). En el tejido conjuntivo se observan vasos sanguíneos de diferentes calibres (v). Corte semifino Azul de toluidina bórax 400X.

Figura 18 a. Bordes de dos plicas de una hembra testigo que muestra el epitelio interfolicular constituido por un epitelio cilíndrico pseudosestratificado secretor (e) y botones de células FAE en los bordes de los folículos linfoides. Se observa la apariencia laxa de las células contenidas en el interior de los folículos linfoides. Hematoxilina-Eosina 788X.



17

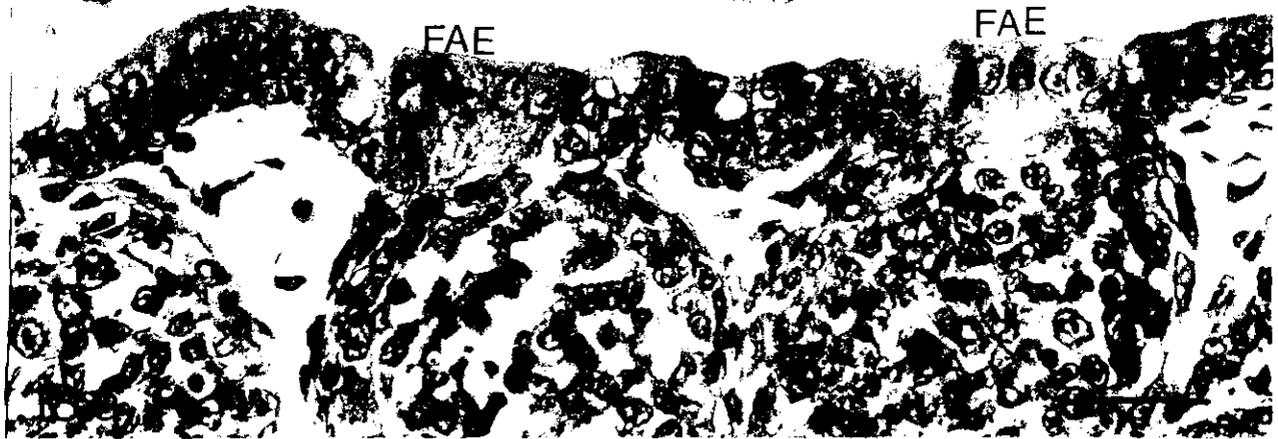


Figura 18b. Bordes de dos plicas de una hembra tratada con DHEA que muestra el epitelio interfolicular constituido por un epitelio cilíndrico secretor (e) y células FAE que semejan tapones sobre el borde apical de los folículos linfoides. Se observa un mayor cantidad de células el interior de los folículos linfoides. Hematoxilina-Eosina 788X.

Figura 18c. Plica con folículos linfoides de una hembra testigo, que muestran en su porción apical botones de células FAE, entre estas células se encuentra el epitelio interfolicular (e). Se aprecia en los folículos linfoides de los organismos testigo una densidad celular menor que en los organismos tratados con DHEA. Hematoxilina-Eosina 200X.

Figura 18d. Plica con folículos linfoides de hembra tratada, que muestran en su borde apical gran cantidad de botones de células FAE, los que claramente se observan mas grandes que los de los animales testigo. Se aprecia una mayor densidad celular dentro de los folículos linfoides de los organismos tratados con DHEA con respecto a los testigo. Hematoxilina-Eosina 200X.

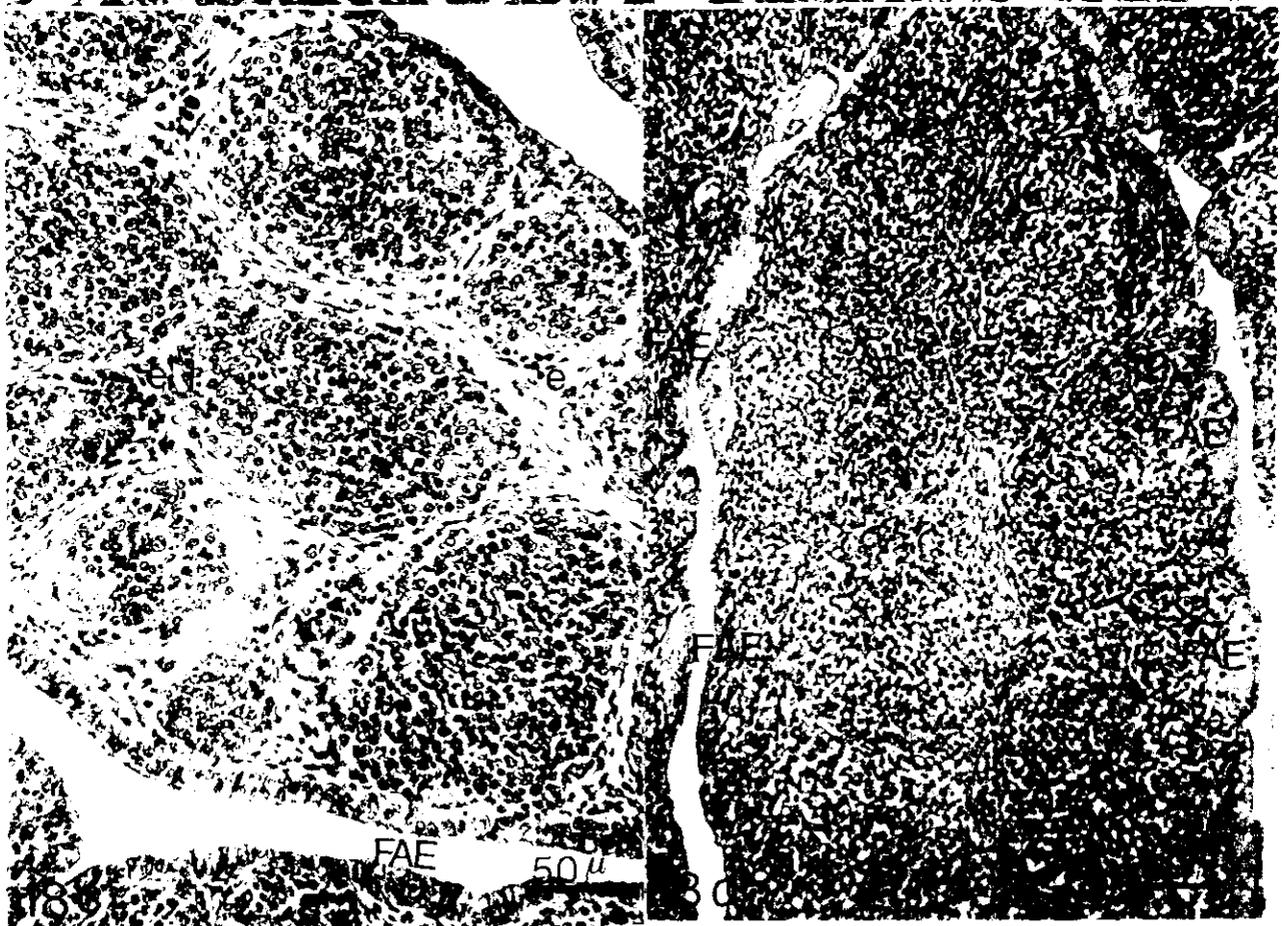


Figura 19a. Foliculo linfoide de macho tratado que muestra la región cortical (C) y medular (M). El límite entre estas dos regiones esta marcado por la presencia de células epiteliales planas (→). La corteza folicular presenta vasos sanguíneos (v). En la médula folicular se encuentran linfocitos (←), células en mitosis (⇔), así como células en apoptosis (➤). El epitelio de revestimiento está constituido por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado secretor (e), que descansa sobre una membrana basal. Corte semifino Azul de toluidina bórax 788X.

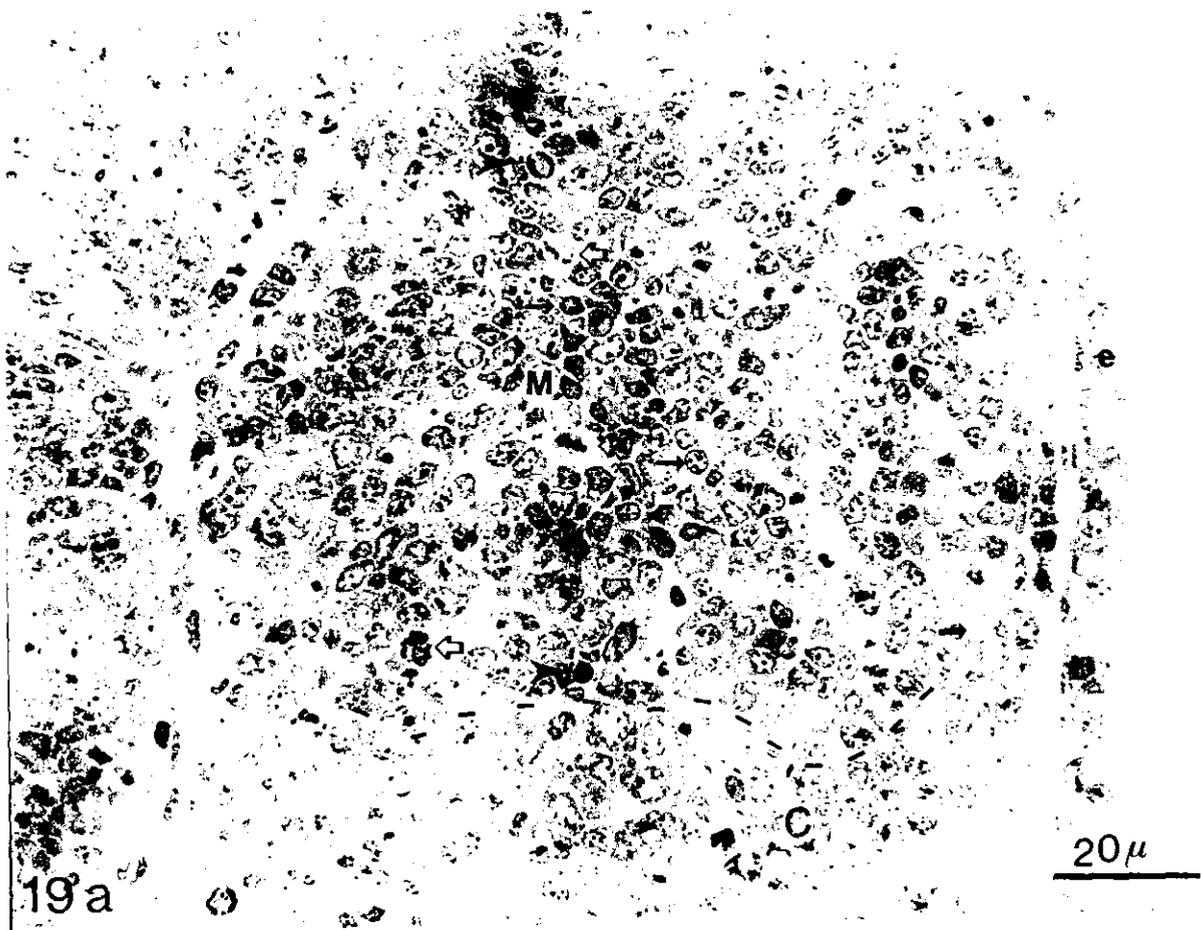


Figura 19b. Se muestran folículos linfoides de macho testigo, con cuerpos apoptóticos (➤), localizados hacia la periferia del folículo. Hematoxilia-Eosina 984X.

Figura 19c. Folículo linfoide de macho tratado, con células en mitosis (➡) tanto en la región cortical (C) como medular (M). Hematoxilia-Eosina 984X.

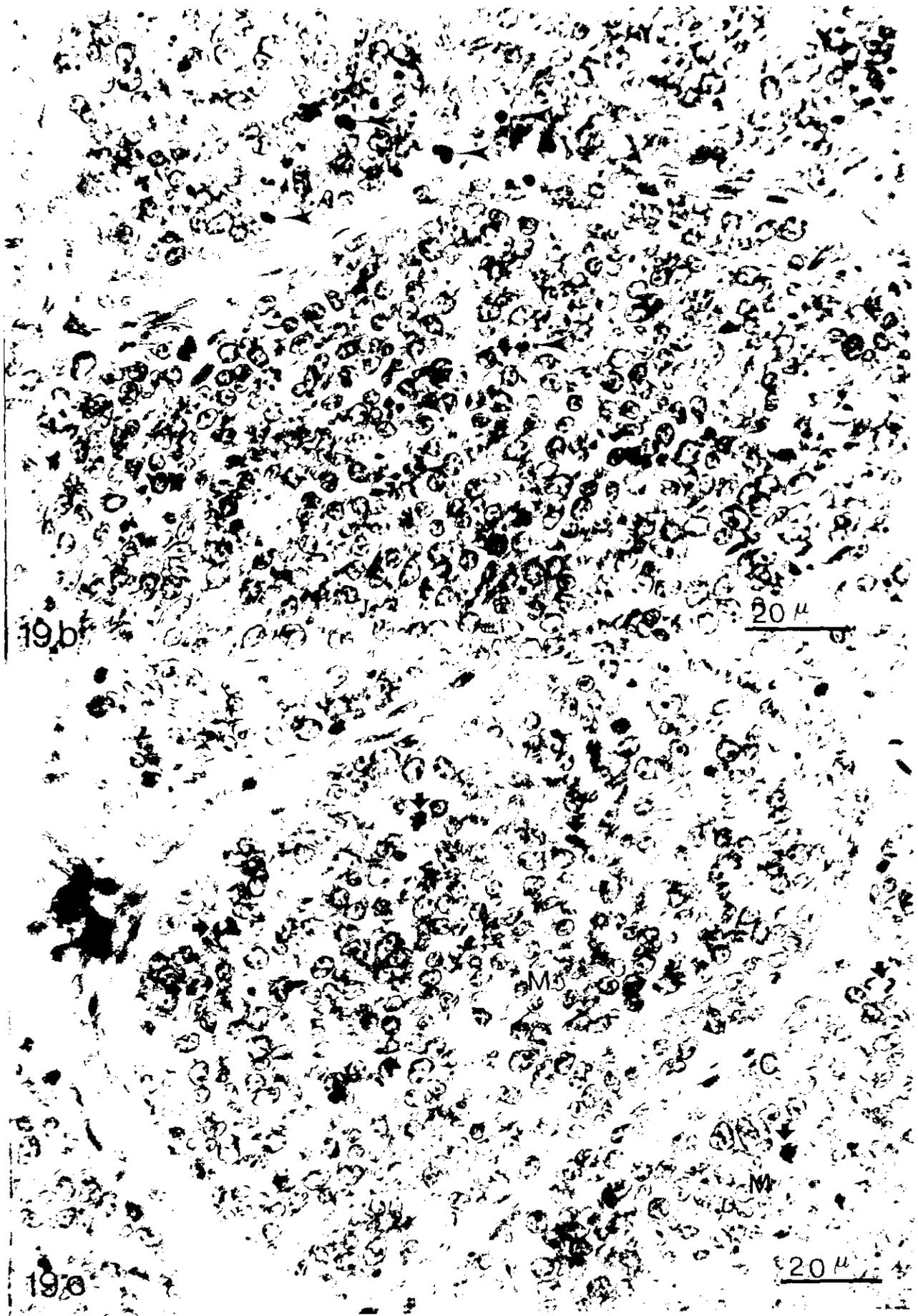


Figura 20a. Folículos linfoides de machos testigo, que muestran cuerpos apoptóticos (➤) en la región medular (M) principalmente. El tejido conjuntivo de la plica emite proyecciones de fibras (tc) para delimitar a cada uno de los folículos (f), existen vasos sanguíneos de diferente calibre (v). En el borde apical existen botones de células FAE y epitelio cilíndrico pseudoestratificado secretor (e). Hematoxilina-Eosina 400X.

Figura 20b. Fólículo linfoide de macho tratado, que muestra la presencia de cuerpos apoptóticos (➤) y mitosis (➔). En el borde apical del fólículo se localizan las células FAE y un epitelio pseudoestratificado secretor. En la porción basal del fólículo se encuentra la capa muscular (m) y tejido conjuntivo (tc). Hematoxilina-Eosina 500X.

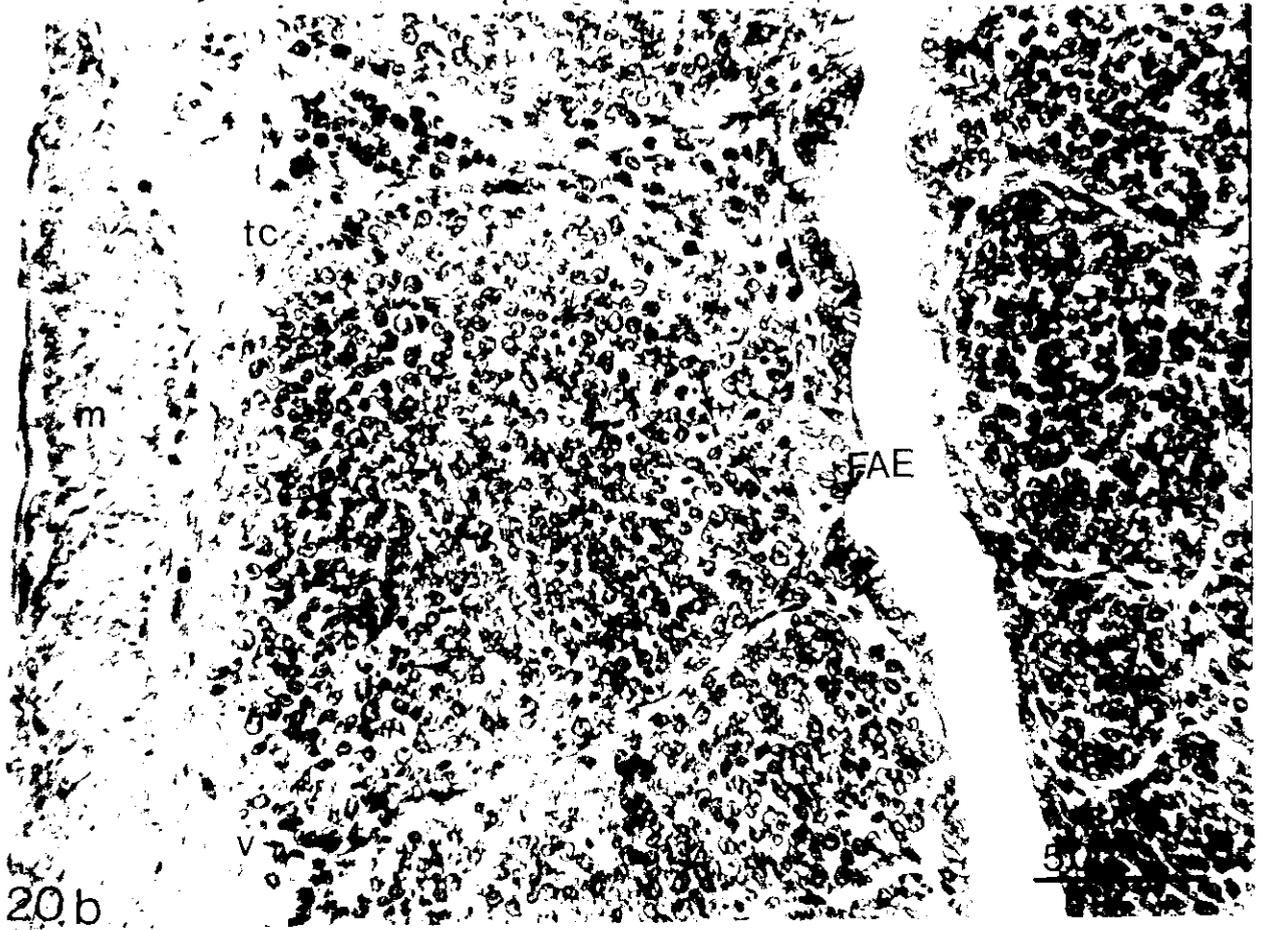
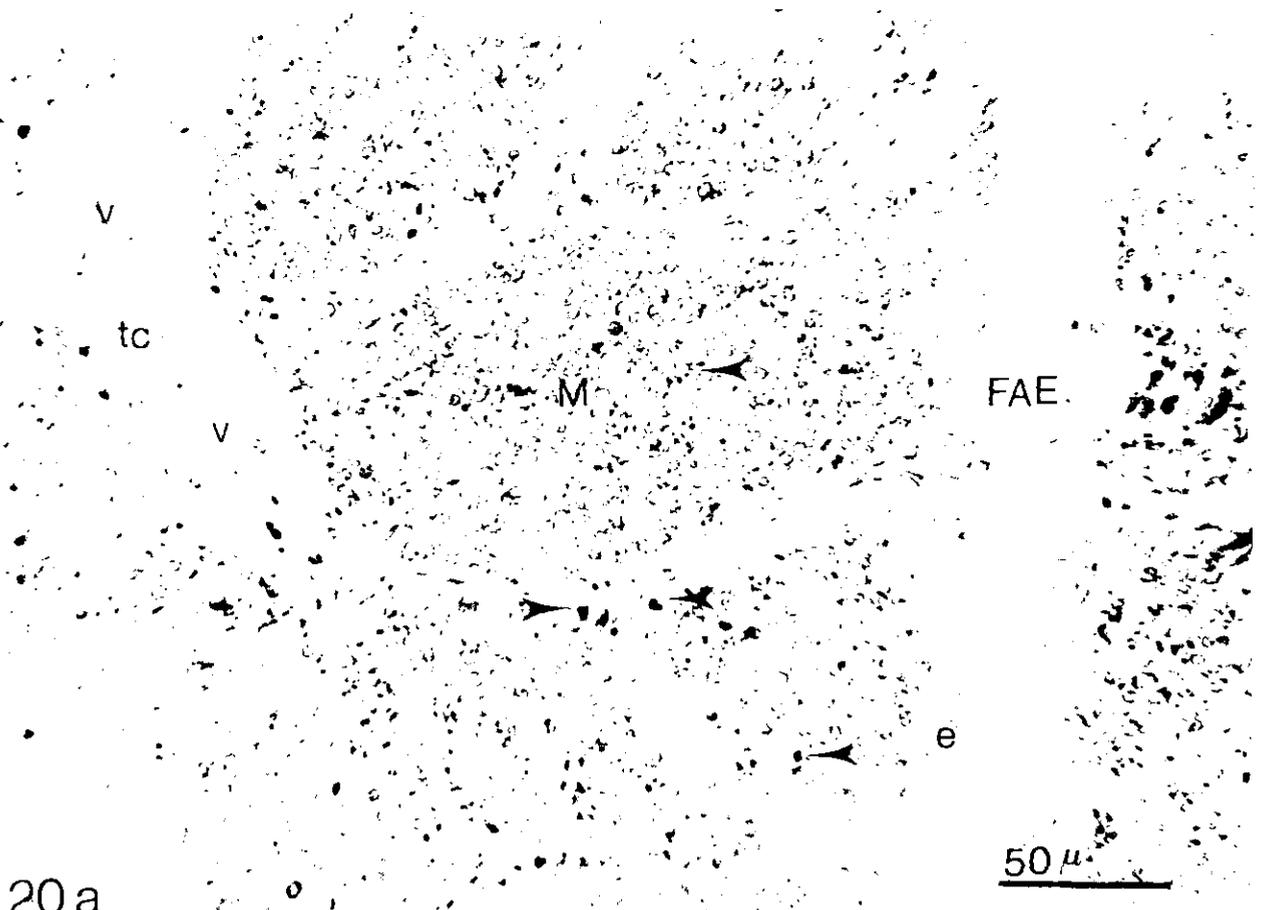
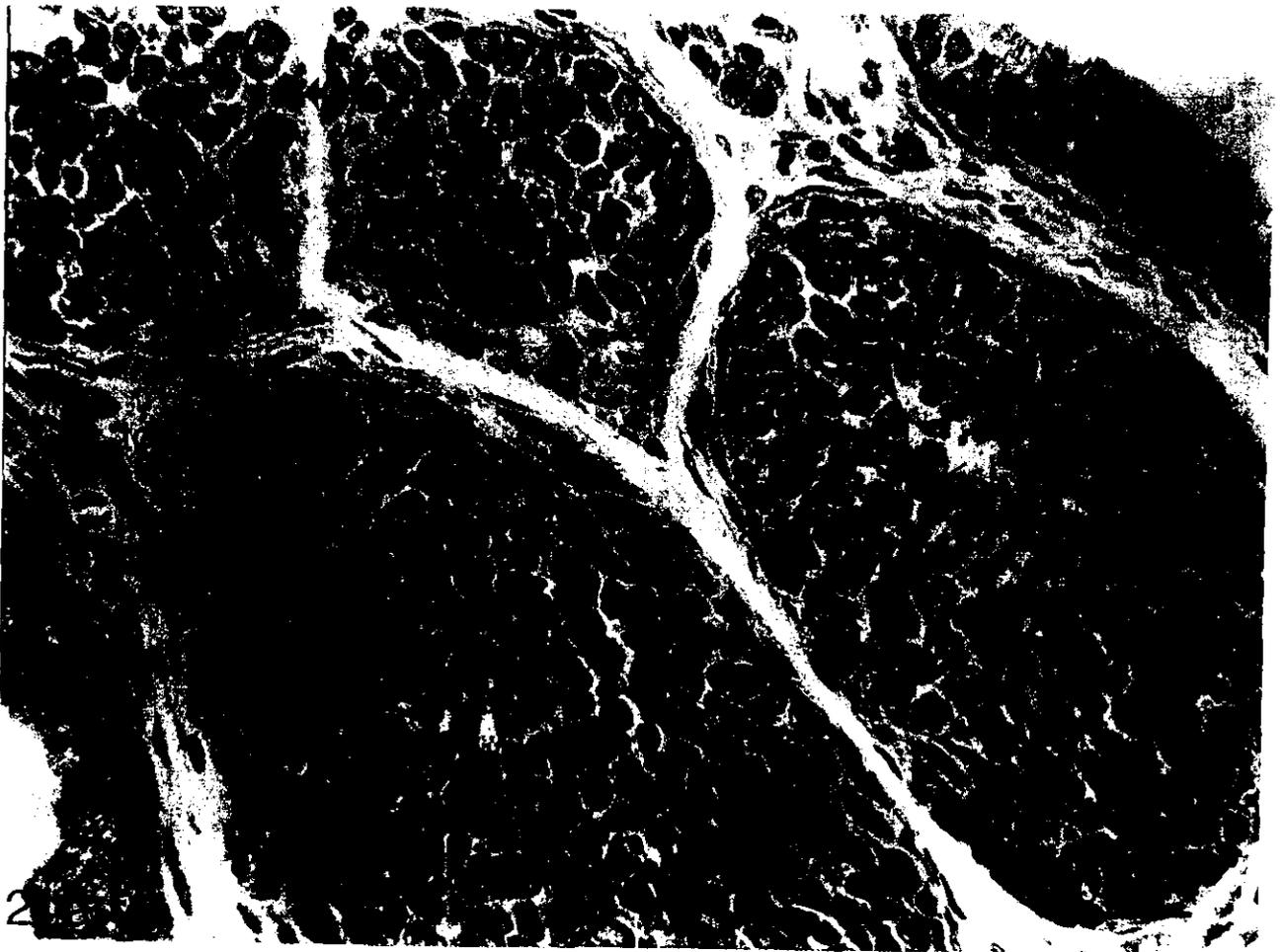


Figura 21a. Folículos linfoides delimitados por tejido conjuntivo (tc) de macho testigo con cuerpos apoptóticos (➤), linfocitos (➔) y algunas células en mitosis (➡). Corte semifino. Azul de toluidina 988X.

Figura 21b. Folículo linfoide de macho tratado con su botón de células FAE, linfocitos (➔), células en mitosis (➡) y algunos cuerpos apoptóticos (➤). Corte semifino. Azul de toluidina 984X.



FAE

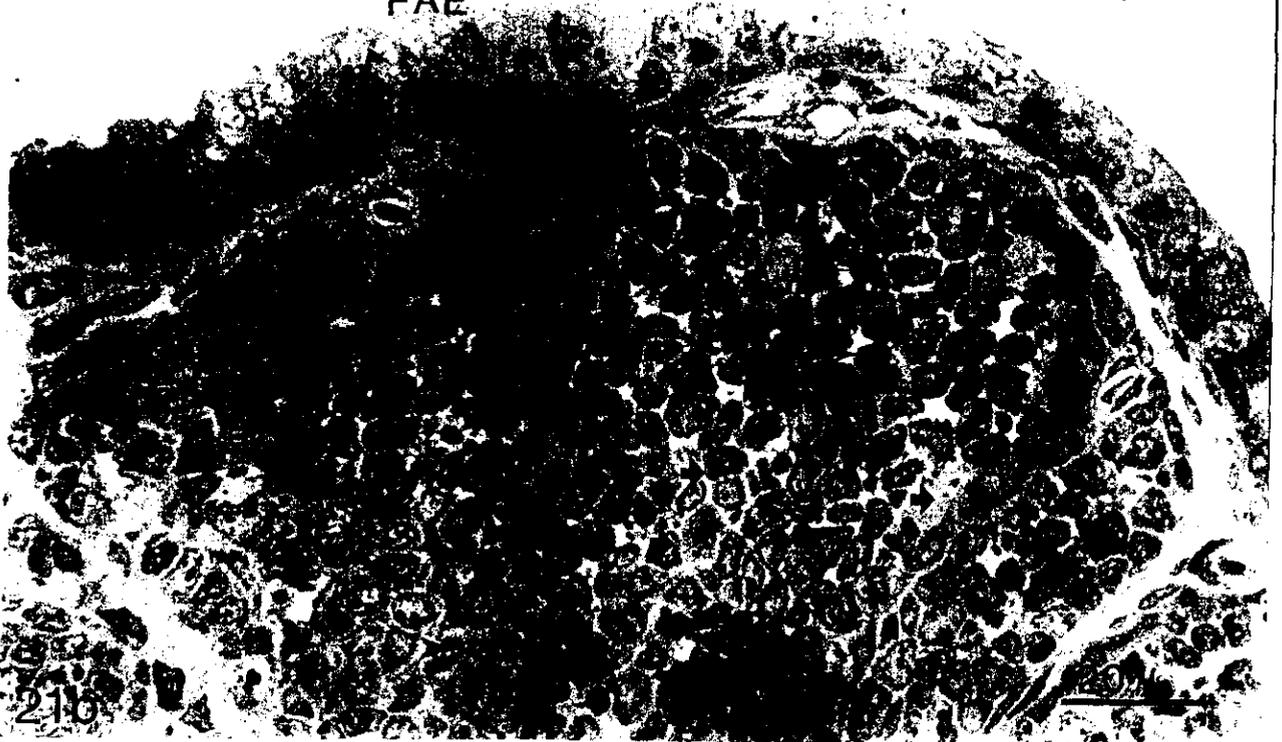


Figura 22a. Foliculo linfoide de macho testigo que muestra cuerpos apoptoticos (→). Los cuerpos apoptoticos se observan tanto en la region del borde folicular como hacia el interior del foliculo linfoide. Hematoxilina-Eosina 984X.

Figura 22b. Foliculo linfoide de macho tratado con DHEA que muestra celulas en mitosis (⇒). Las mitosis se observan en la periferia del foliculo y en la region medular. Hematoxilina-Eosina 984X.

Figura 23a. Foliculos linfoides de hembra testigo, que muestran en el borde apical de algunos de los foliculos botones de celulas FAE, asi como corpúsculos de *Hassal* (h) en la porcion medular del foliculo. Estas estructuras son acidófilas y estan constituidas por celulas Rep pálidas. Entre los foliculos linfoides existe una gran cantidad de heterófilos (e) y tejidos conjuntivo que tiene una apariencia laxa (tc). Hematoxilina-Eosina 200X.

Figura 23b. Foliculos linfoides de hembra tratada que muestran la presencia de corpúsculos de *Hassal* (h) en la porcion medular. Estas estructuras son acidófilas y estan constituidas por celulas Rep pálidas. Tambien se observan botones de celulas FAE en el borde apical de los foliculos linfoides. Existen pocos heterófilos (e) en el espacio interfolicular y el tejido conjuntivo (tc) presenta un arreglo menos laxo que en los animales testigo. Hematoxilina-Eosina 200X.

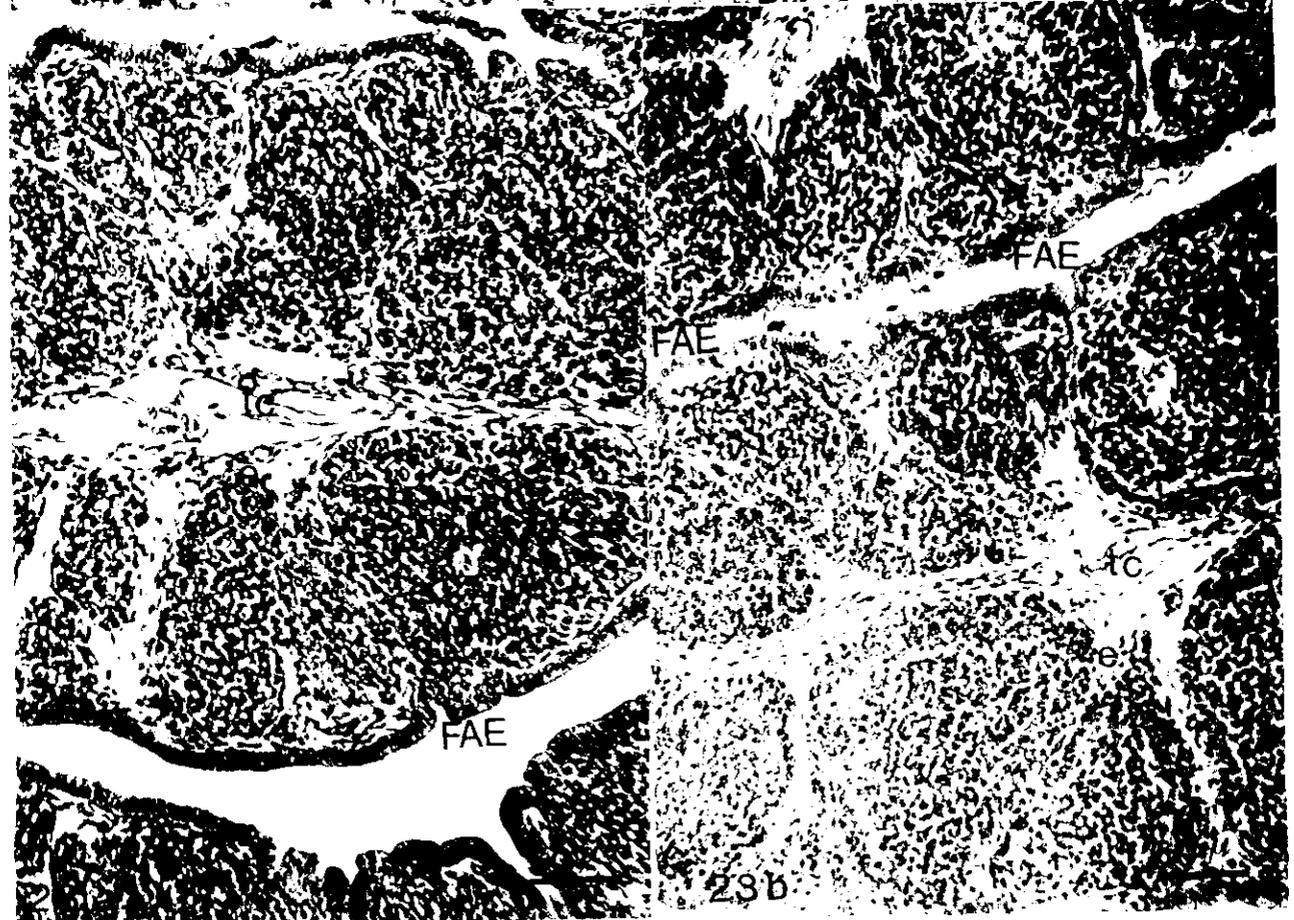
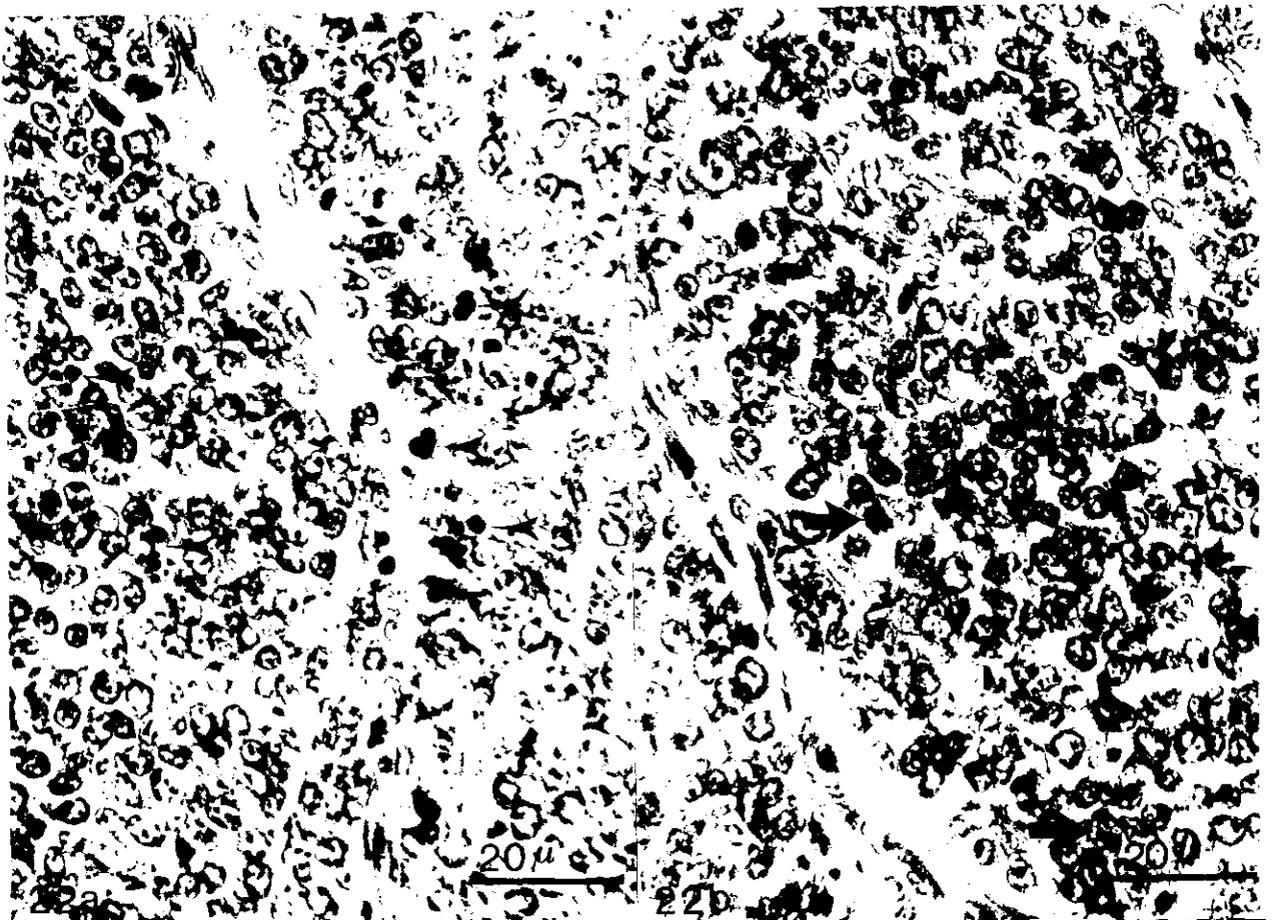
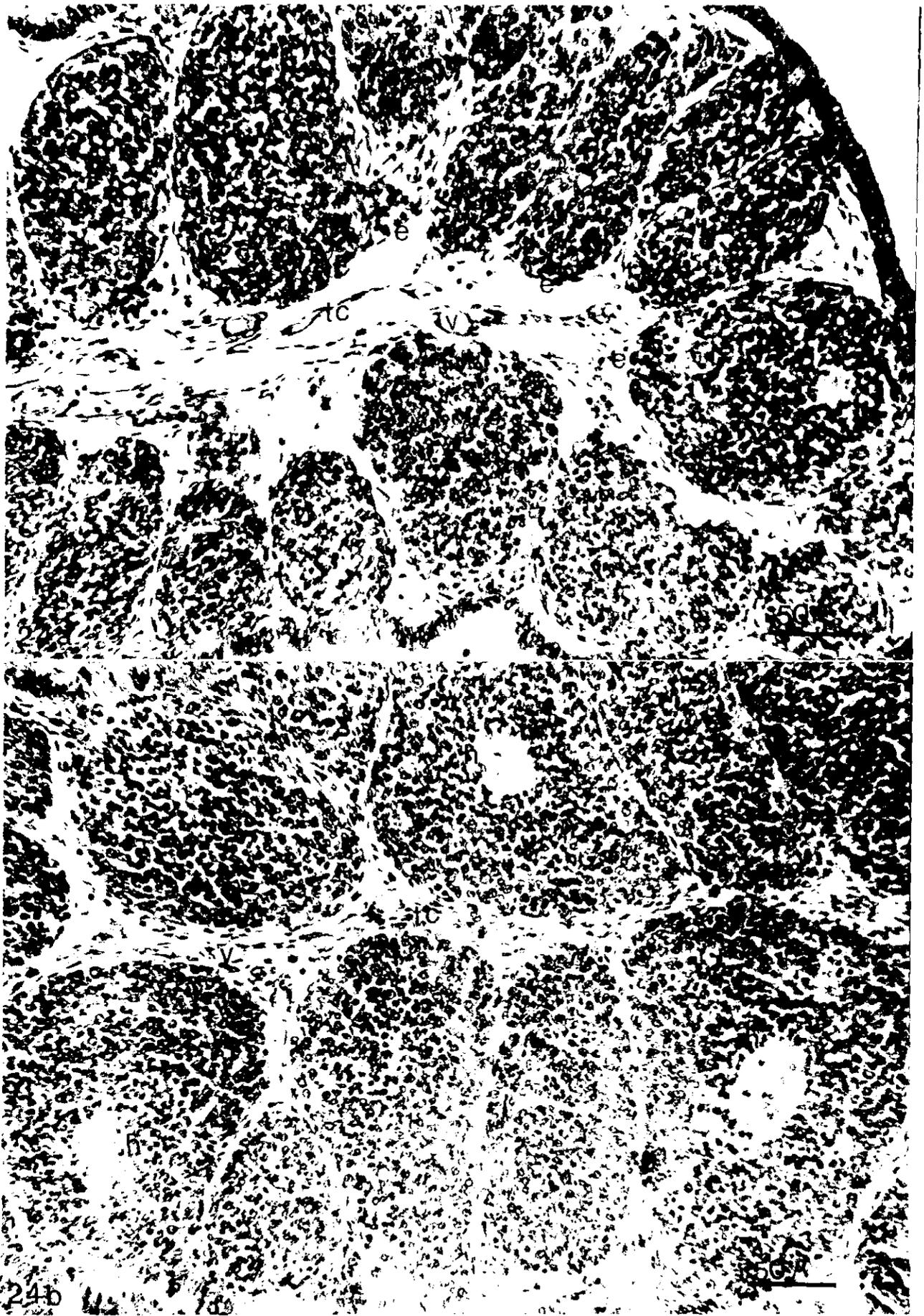


Figura 24 a. Foliculos linfoides de hembra testigo que presentan en su borde basal gran cantidad de heterófilos (e). En la parte central de uno de los foliculos se observa la presencia de un corpusculo de *Hassall* (h). El tejido conjuntivo (tc) que se encuentra entre los foliculos linfoides presenta una apariencia laxa y algunos vasos sanguineos (v). Hematoxilina-Eosina 320X.

Figura 24b. Foliculos linfoides de hembra tratada con DHEA que muestran en la parte central corpúsculos de *Hassall* (h). La presencia de estas estructuras fue muy frecuente en los organismos tratados. En el interior de los foliculos linfoides es notoria apariencia apretada entre las celulas. Se distingue en los foliculos linfoides la presencia de corteza C y médula (M). Se observa tejido conjuntivo (tc) entre los foliculos con una apariencia poco laxa y la presencia de algunos vasos sanguineos. Hematoxilina-Eosina 320X.

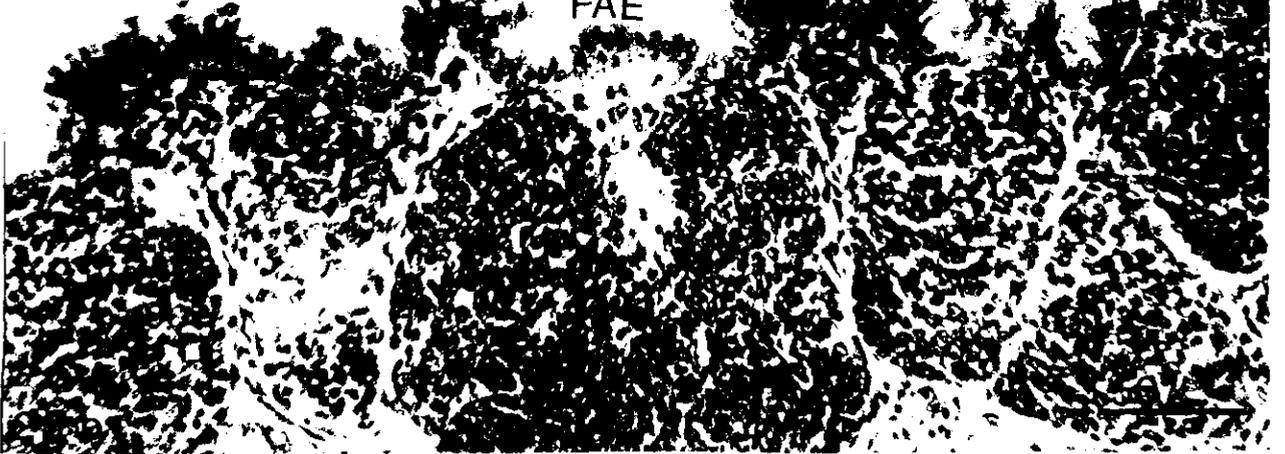
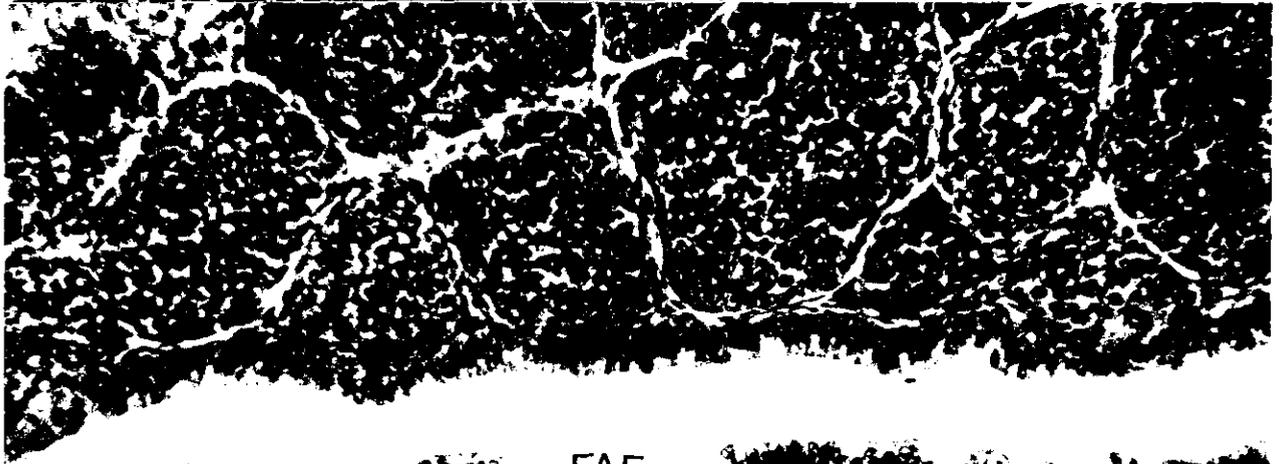
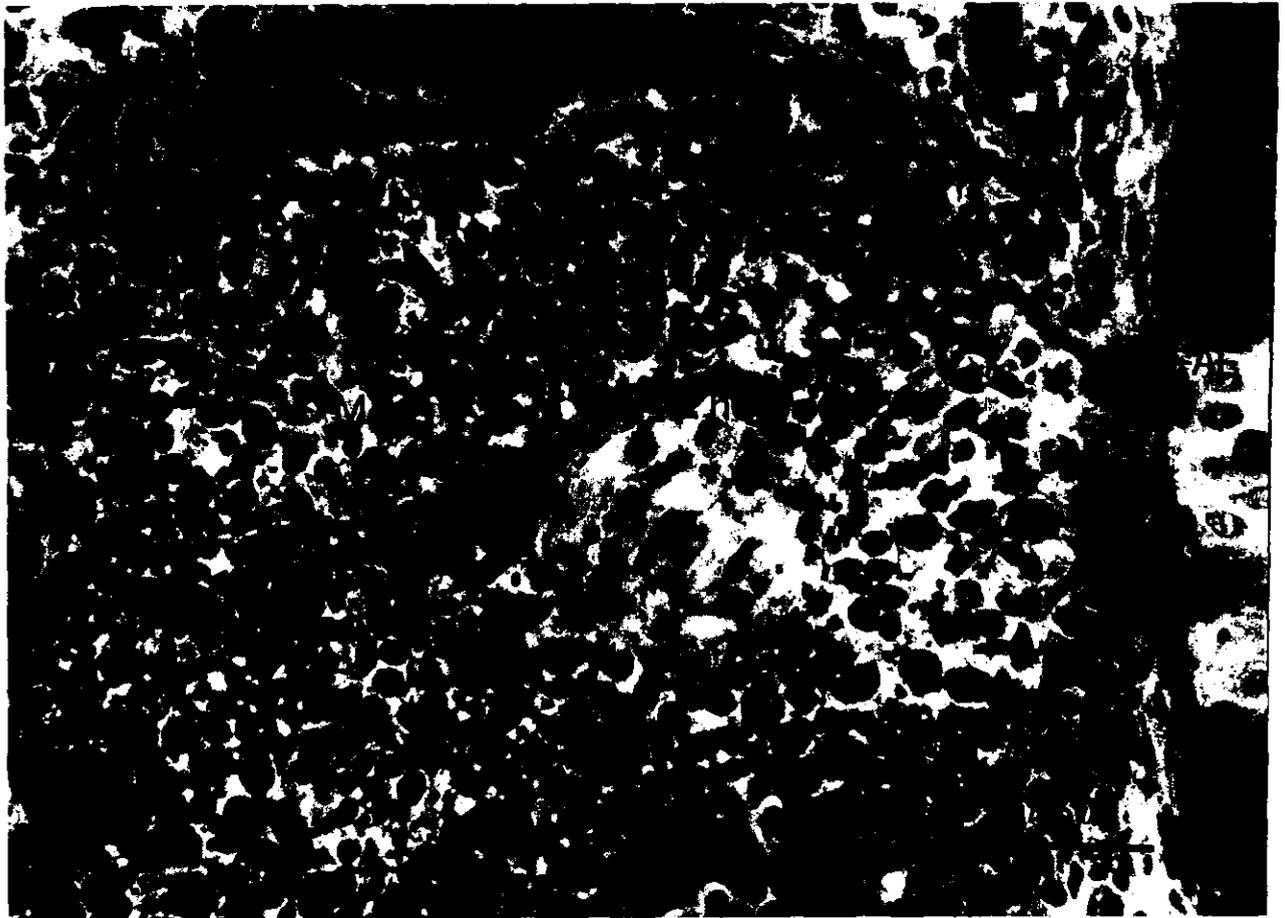


24b

GSA

Figura 25a. Folículo linfoide de hembra tratada, que muestra la estructura semejante al “corpúsculo de *Hassal*” (h), las células Rep claras tienen un citoplasma claro y se arreglan en forma concéntrica. En la médula se observan linfocitos (l). Los cuerpos apoptóticos se ubican en diferentes regiones de la médula (➤) Las células FAE con apariencia globosa, muestran un citoplasma claro y un núcleo grande, se encuentran en el borde apical del folículo en contacto directo con la médula Corte semifino. Azul de toluidina bórax 320X.

Figura 25b. Folículo linfoide de hembra testigo que muestra la formación del corpúsculo de Hassall (➤) por debajo de las células FAE. Tricrómica de Masson 320X.



FAE

Figura 26a. Foliculos linfoides de hembra testigo que muestran la ausencia de corteza. En el espacio interfolicular se observan gran cantidad de heterófilos (e), el tejido conjuntivo se aprecia con vasos sanguíneos de diferente calibre (v). Hematoxilina-Eosina 788X.

Figura 26b. Foliculos linfoides de hembra tratada que muestra una médula (M) y una corteza (C) bien definida, se observan algunas mitosis (➡) en estos dos compartimentos. El espacio interfolicular son pocos los heterófilos (e) que hay, el tejido conjuntivo (tc) presenta una apariencia poco laxa. Hematoxilina-Eosina 788X.

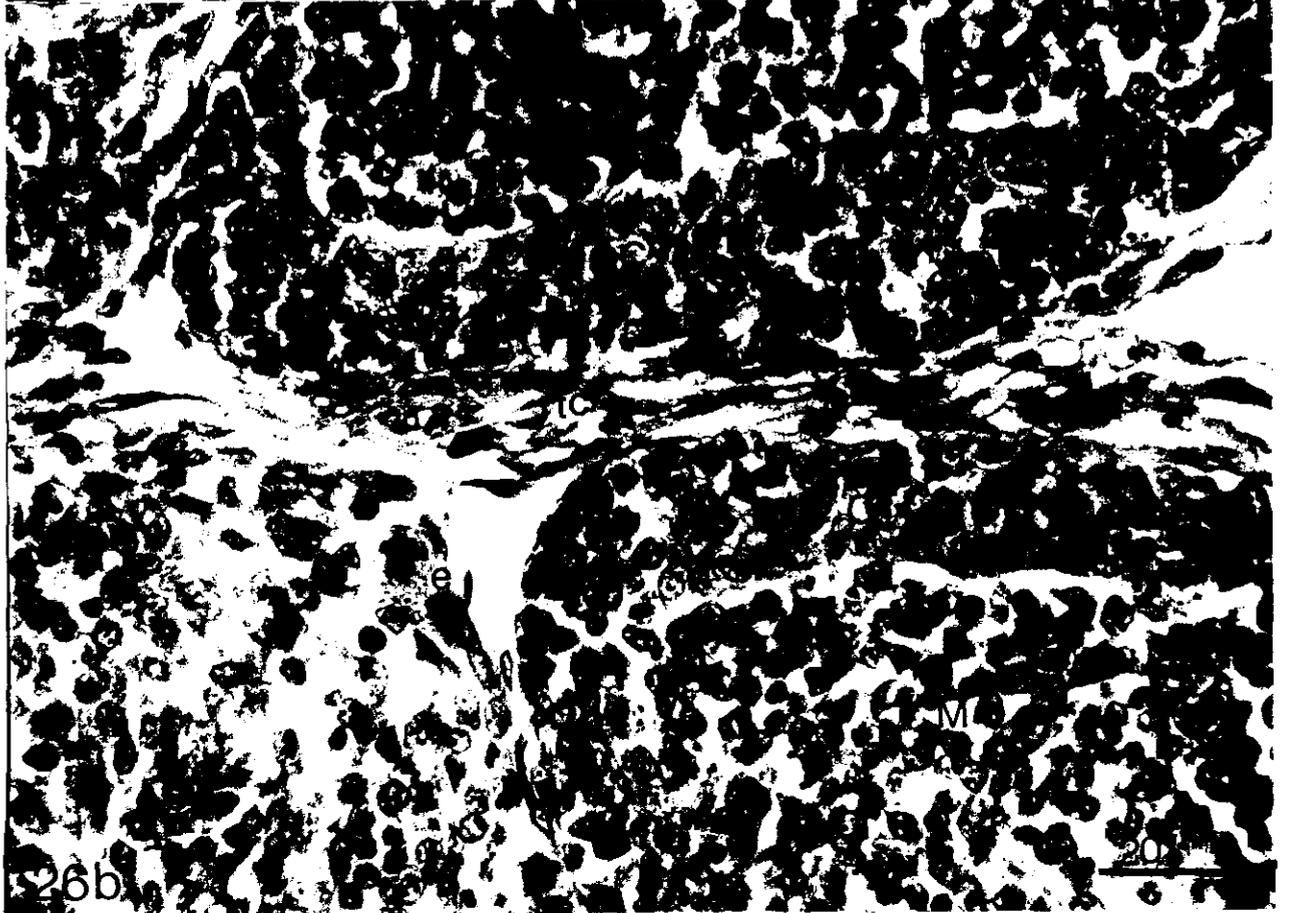
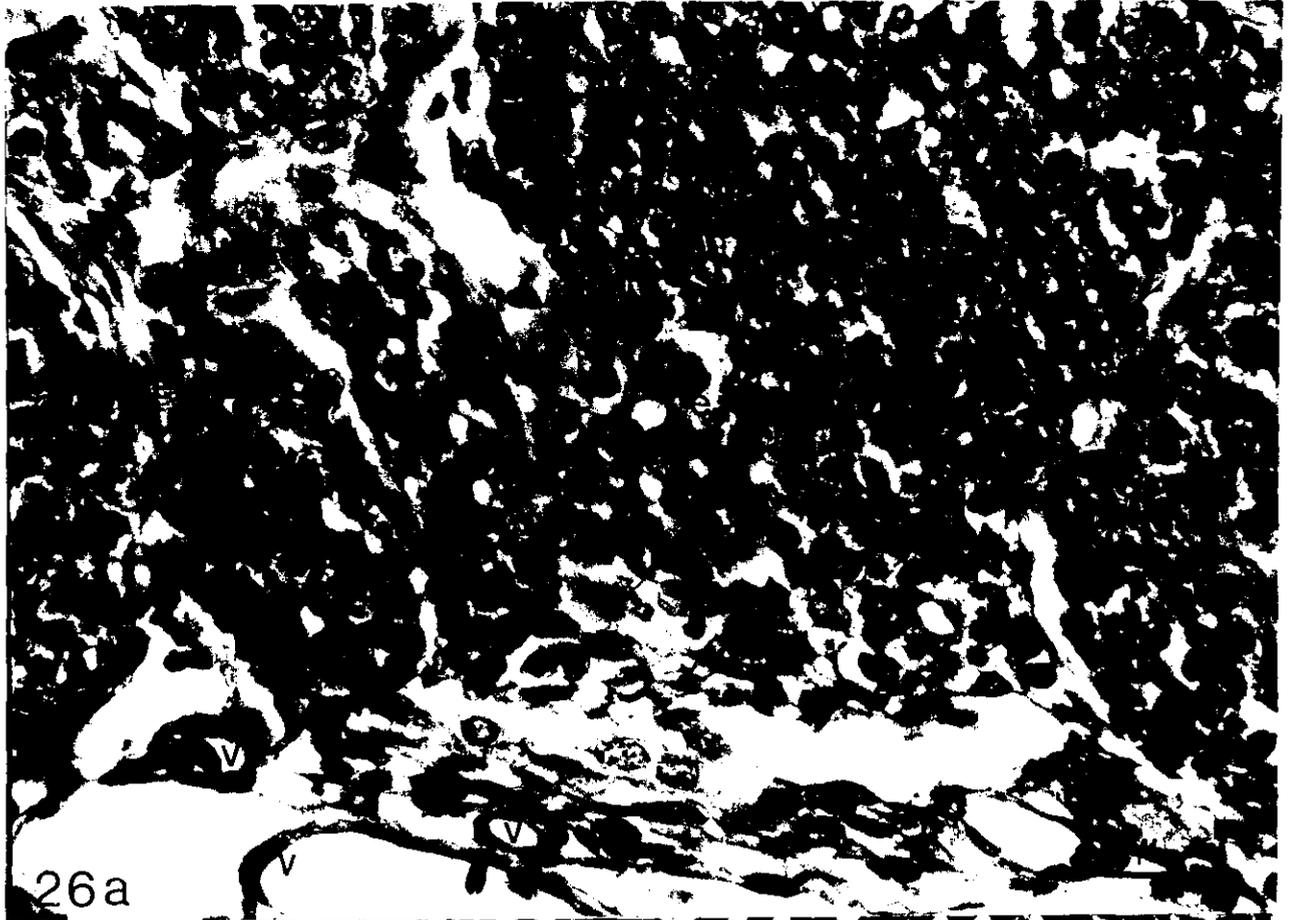


Figura 27a. Folículos linfoides de macho testigo, que en su interior presentan células con núcleos picnoticos que corresponden a células en apoptosis. entre los límites de los folículos se encuentran una gran cantidad de heterófilos (e). Hematoxilina-Eosina 200X.

Figura 27b. Folículos linfoides de macho tratado que muestran en su borde apical botones de células FAE. Entre los límites foliculares se observan pocos heterófilos (e). Hematoxilina-Eosina 200X.

Figura 28a. Fibras reticulares que constituyen el estroma de las plicas de la bursa de Fabricio de hembra testigo. La fibras reticulares (r) delimitan a cada uno de los folículos linfoides (f). Gomori 62.5X.

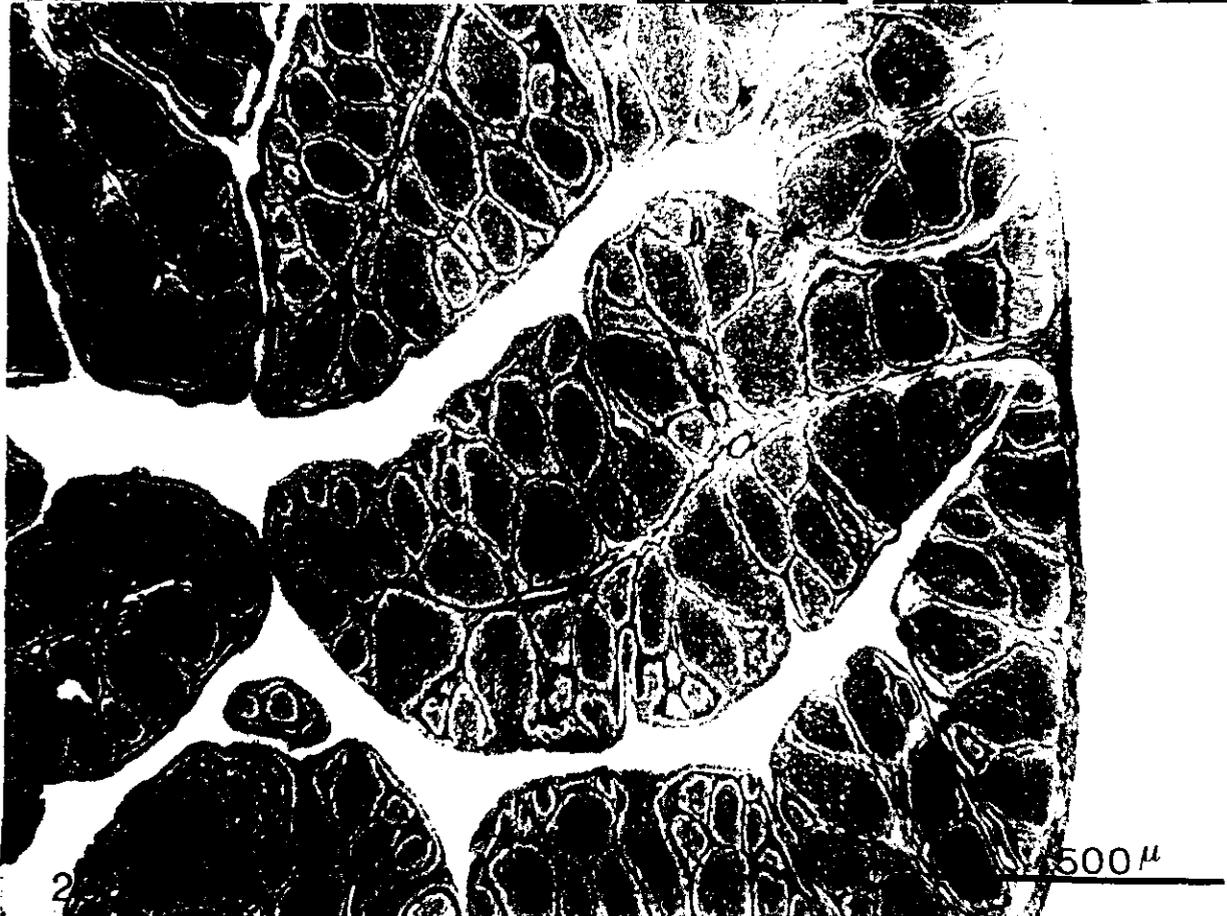
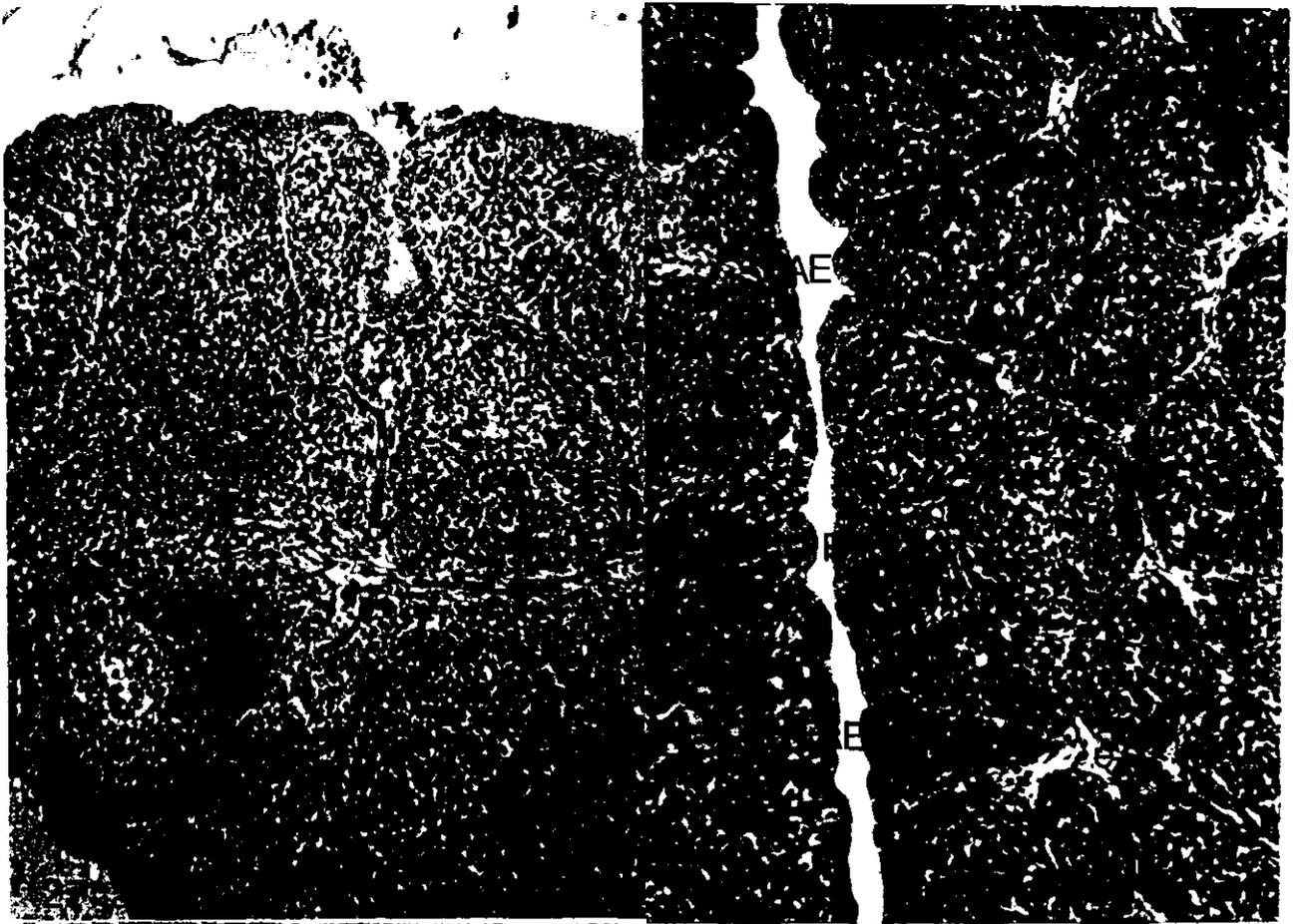


Figura 28b. Fibras reticulares que delimitan los folículos linfoides de la bursa de hembra testigo. La trama de fibras reticulares que forman la membrana basal (mb) se interrumpen a nivel de las células FAE, quedando estas células en contacto directo con la médula folicular. Pequeñas fibras muy delgadas comienzan a penetrar al interior del folículo a nivel de la corteza (←). Gomori 400X.

Figura 28c. Fibras reticulares que delimitan los folículos linfoides de la bursa de hembra tratada. La trama de fibras reticulares que forman la membrana basal (mb) se interrumpen a nivel de las células FAE. Fibras reticulares muy delgadas penetran hacia el interior del folículo linfoide (f) en lo que corresponde a la corteza (←). La presencia de fibras reticulares finas a este nivel en los folículos linfoides, se presentó con una frecuencia mayor en los organismos tratados. Gomori. 400X .

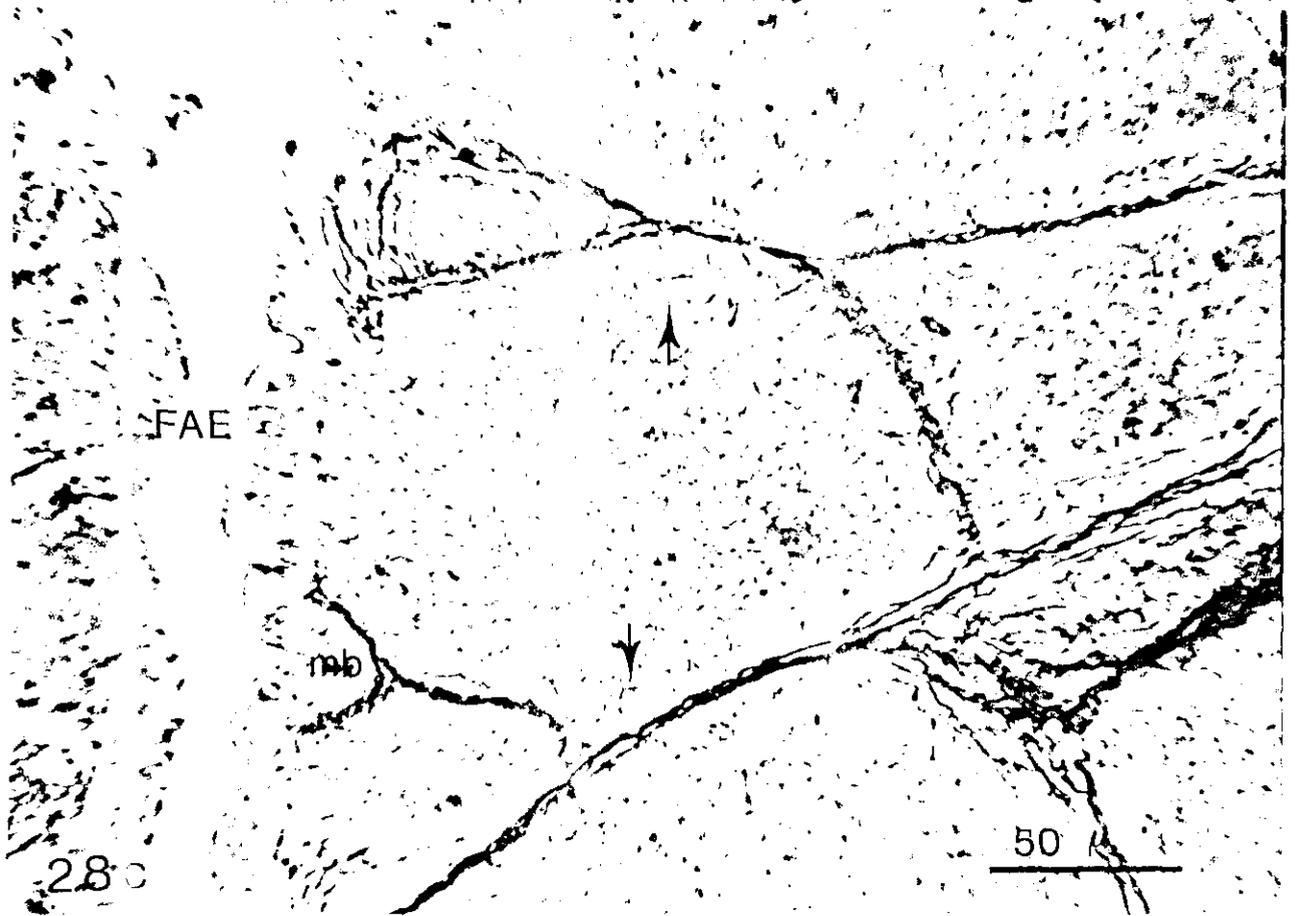
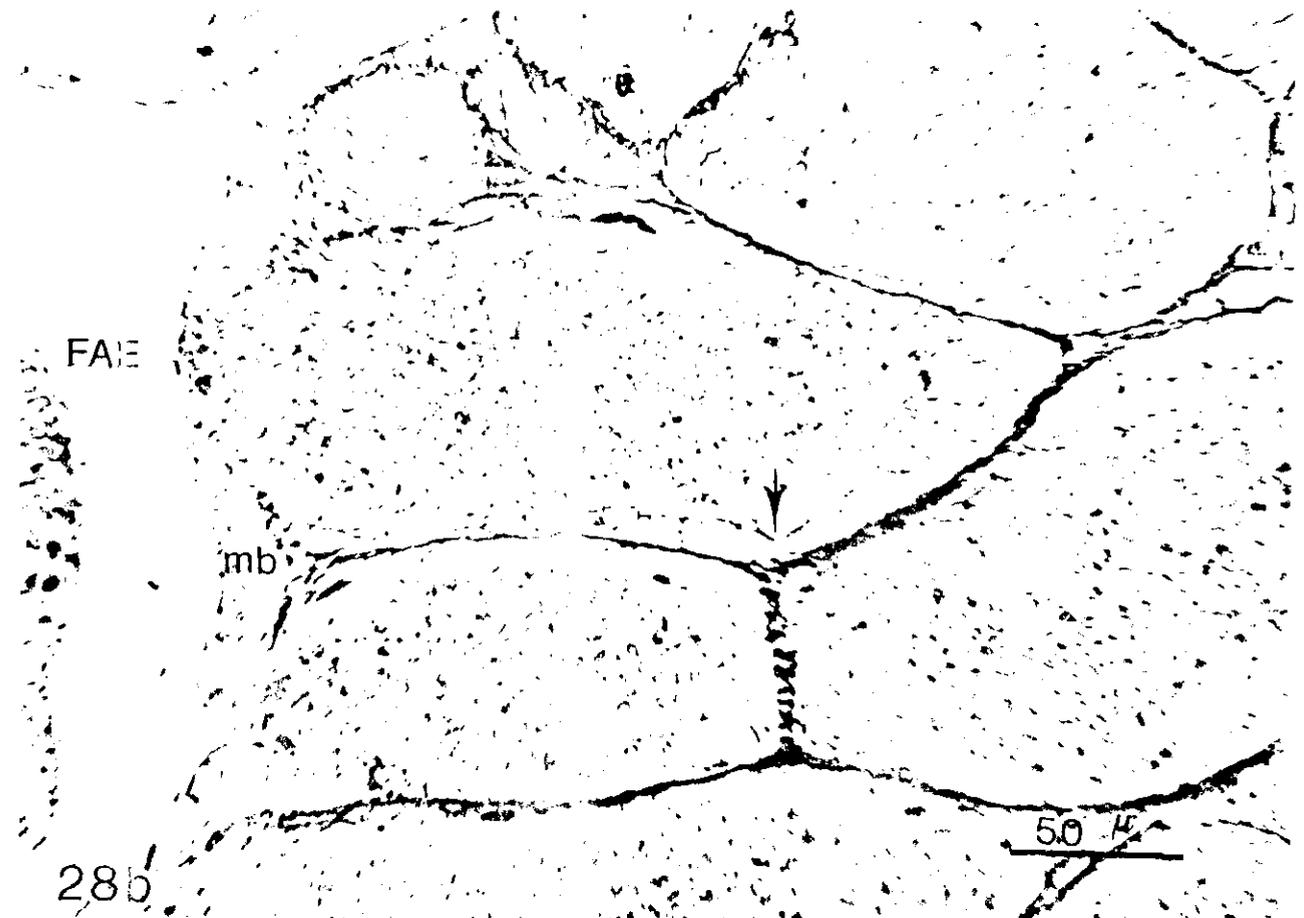
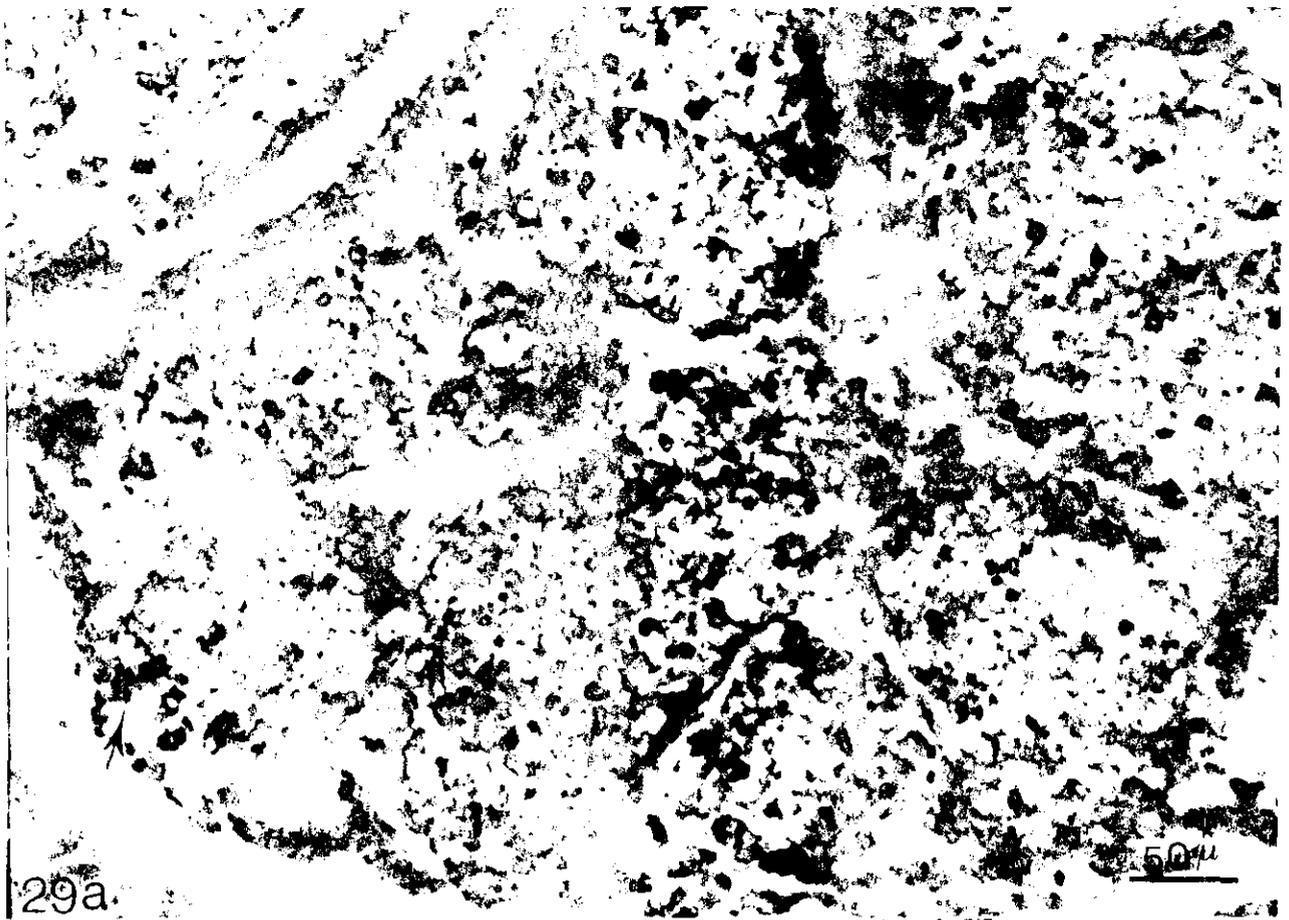


Figura 29a. Células Tap 1⁺ (Ia⁺) de macho testigo, localizadas de manera irregular en los folículos linfoides y escasamente en el médula. La reacción positiva se observa cerca del borde del epitelio, como si las células Ia⁺ estuvieran por debajo con las células FAE (→). Se nota la ausencia de prolongaciones citoplásmicas. Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol contrastada con hematoxilina 200X.

Figura 29b. Células Tap 1⁺ (Ia⁺) de macho tratado, se localizan en la porción del borde folicular y hacia el interior de la médula (➤). La reacción positiva se observa también en el borde del epitelio, como si las células Ia⁺ estuvieran intercaladas con las células FAE (→). Las células Ia⁺ se observan con pequeños brazos que parecen envolver a las demás células que se encuentran en el folículo. Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol 200X.



29a

50 μ



29b

50 μ

Figura 30a. Células Tap 1⁺ (Ia⁺) de macho testigo, en los folículos linfoides. La distribución de las células es muy difusa en estos folículos; se observan prolongaciones citoplasmáticas cortas y escasas (→). Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol contrastada con hematoxilina 500X.

Figura 30b. Células Tap 1⁺ (Ia⁺) de macho tratado en los folículos linfoides. La cantidad de células Ia⁺ es mas evidente que en los testigo y se encuentran en el borde y en la porción medular del folículo. Se observan prolongaciones citoplasmáticas un poco mas largas y gruesas (→) y el soma (s) de las células Ia⁺. Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol contrastada con hematoxilina 500X

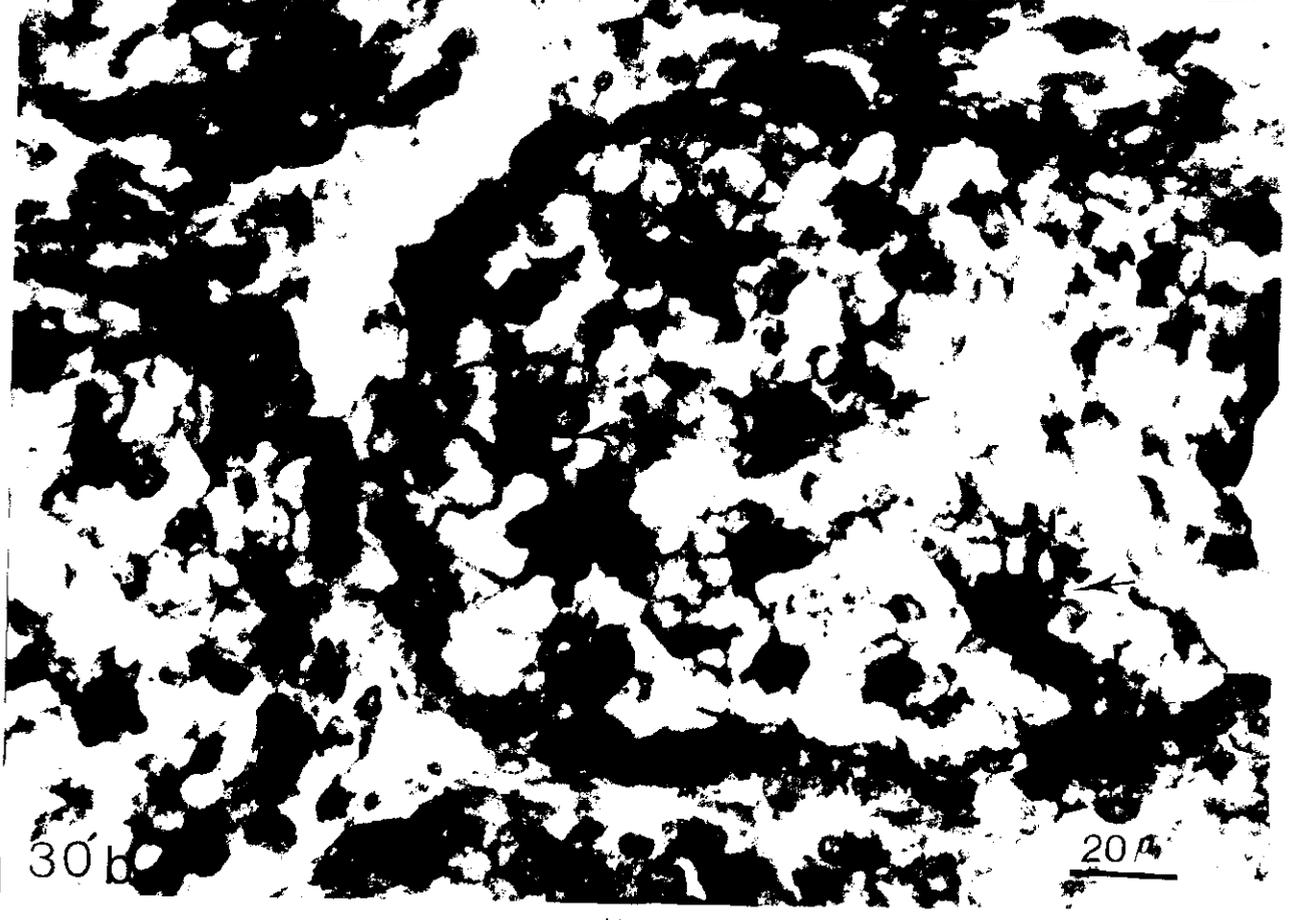
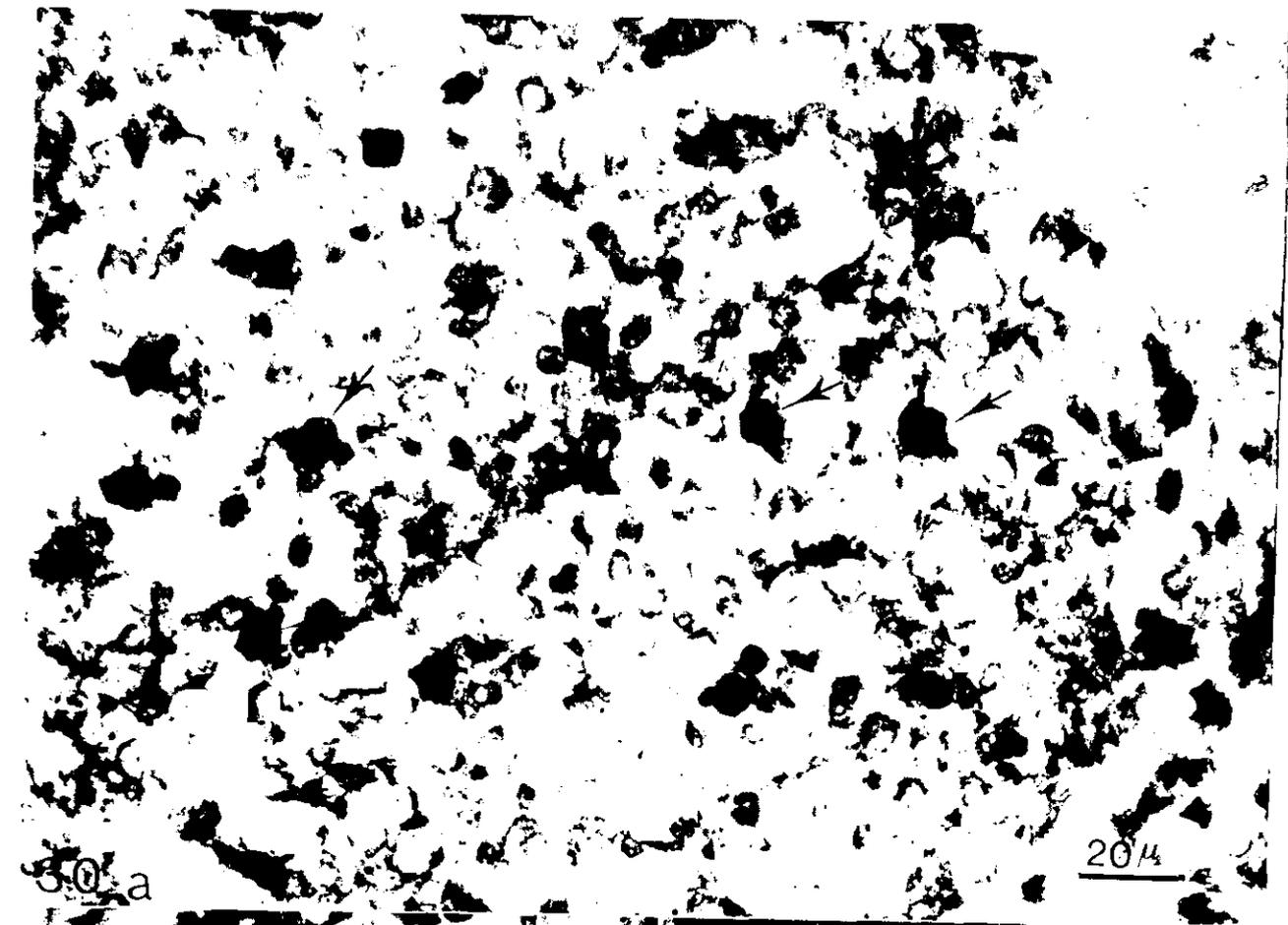


Figura 3 1a. Células Tap 1^+ (Ia^+) de macho testigo en un folículo linfoide, que muestra los somas (s) de las células Ia^+ y la ausencia de proyecciones citoplasmáticas. Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol contrastada con hematoxilina 1250X.

Figura 3 1b. Células Tap 1^+ (Ia^+) de macho tratado en un folículo linfoide, que muestra la trama que forman las proyecciones citoplasmáticas de las células Ia^+ (\rightarrow), dando la apariencia de que estuvieran envolviendo a los demás elementos celulares contenidos en el folículo linfoide. Se observa una célula Ia^+ con su núcleo y su nucleólo rodeada por un citoplasma con una reacción positiva intensa. Inmunocitoquímica estreptavidina-biotina-peroxidasa, acoplado con amino-etil-carbazol contrastada con hematoxilina 1250X.

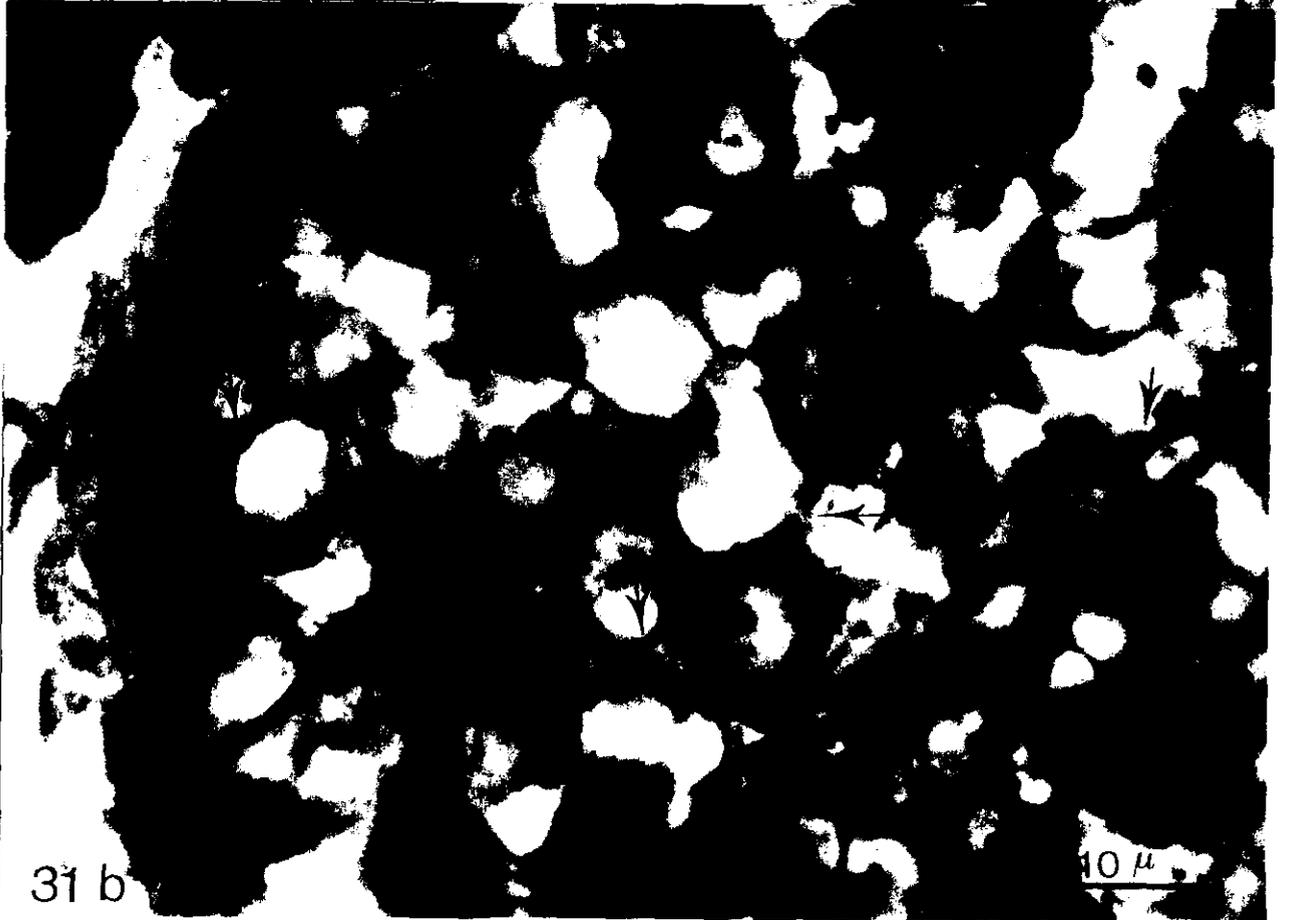


Figura 32a. Foliculo linfoide de hembra testigo, que muestra cuerpos apoptoticos (➤). Bromuro de etidio 1250X.

Figura 32b. Foliculo linfoide de hembra tratada, con células en mitosis (➡). Bromuro de etidio 1250X.

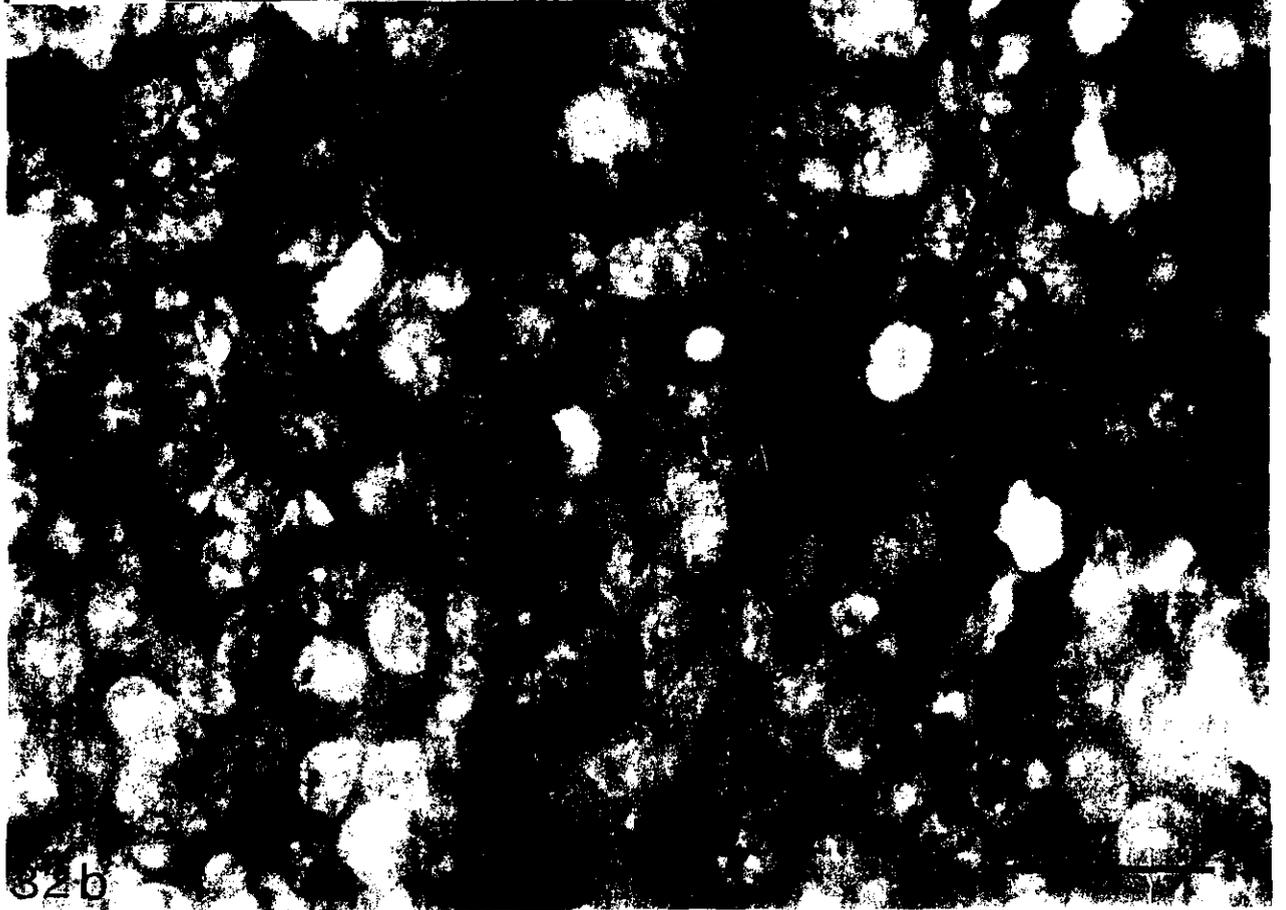
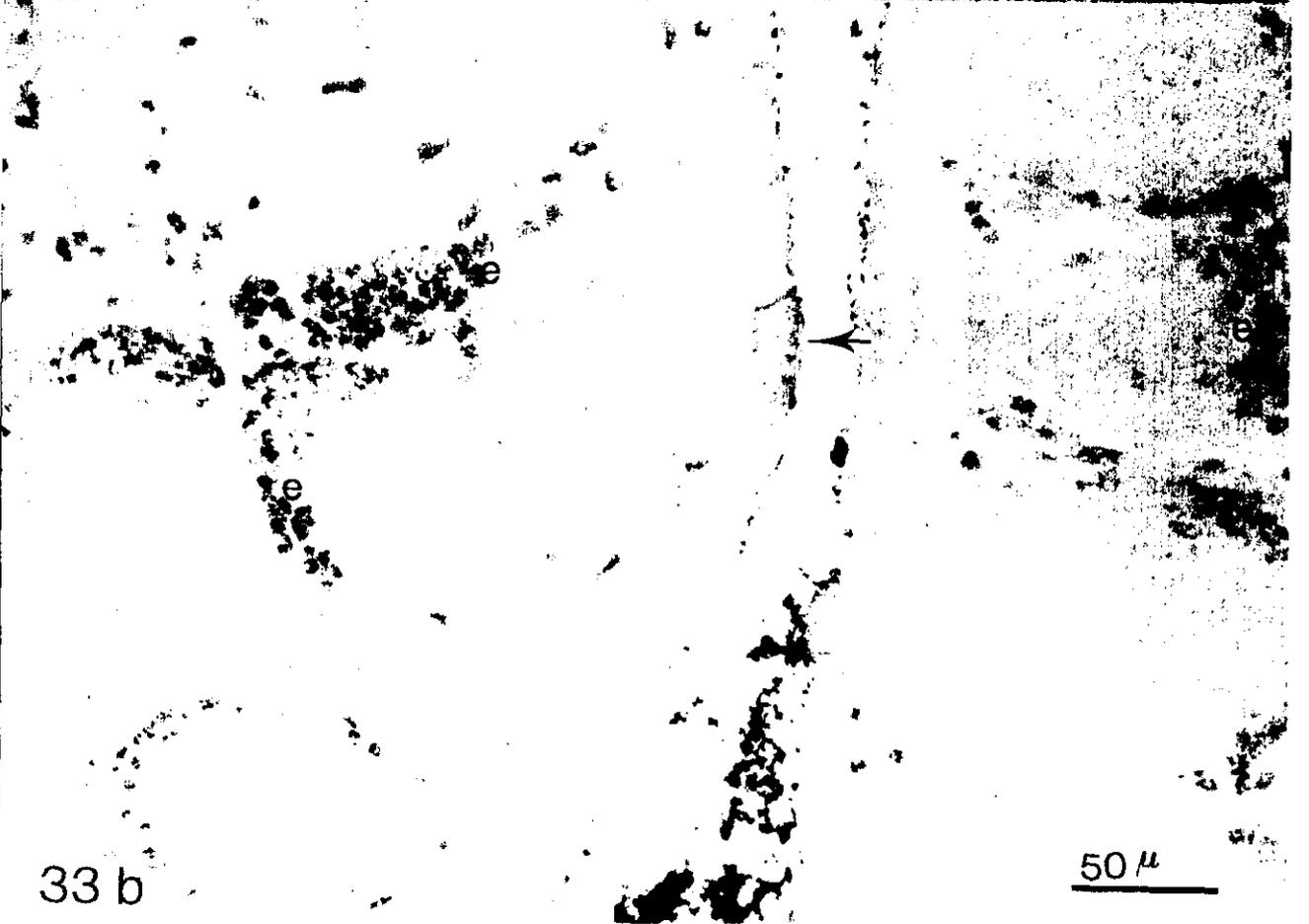
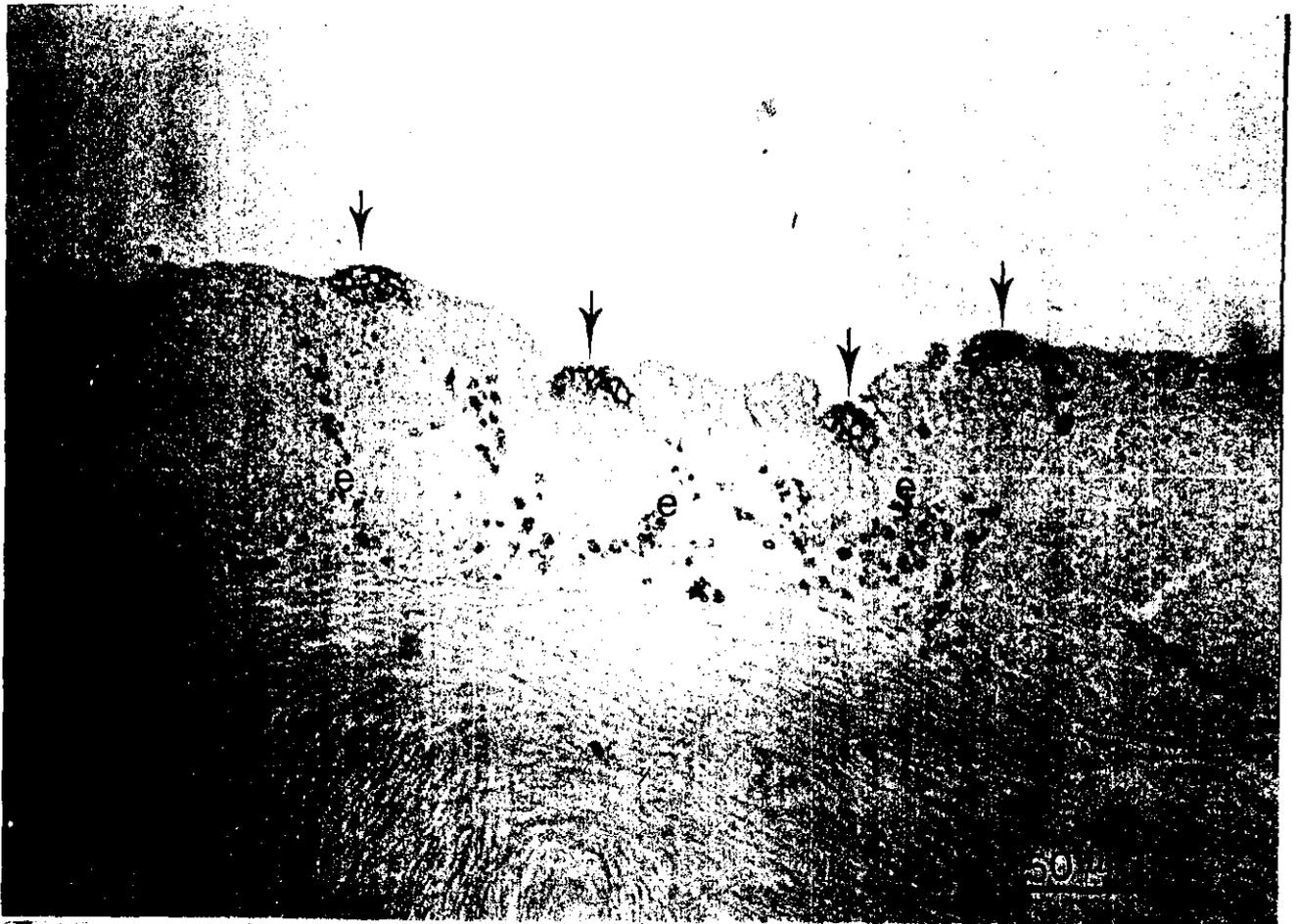


Figura 33a. Foliculos linfoides de hembra tratada, que muestran la presencia de células epiteliales asociadas al folículo (FAE) cargadas de tinta china (→), aunque existen heterófilos en el límite entre los foliculos linfoides (e) estos se encuentran en menor cantidad que en los testigos. Eosina 250X.

Figura 33b. Revestimiento epitelial de la bursa de hembra testigo, que muestra la pequeña cantidad de tinta china en el interior de las células FAE (→). Es notable la cantidad de heterófilos presentes en el borde de los foliculos (e). Eosina 400X.



33 b

Figura 33c. Células FAE de hembra testigo, que muestran pequeñas partículas de tinta fagocitada en su interior después de tres horas de haber sido inyectada por la cloaca (→). La tinta china que no fue fagocitada parece como adherida al epitelio de revestimiento. Existen heterófilos entre los folículos (e). Eosina 788X.

Figura 33d. Células FAE de hembra tratada, que contiene partículas de tinta china después de tres horas de haber sido inyectada por la cloaca.(→). Eosina 788X.



X. Bibliografía consultada

1. Ackerman G.A. 1962. Electron microscopy of the bursa of Fabricius of the embryonic chick with particular reference to the lympho-epithelial nodules. *J. Cell Biol.* 13: 127-146.
2. Aguilar M.C., Romano M. and Pedernera E. 1981. Ultrastructure of Leydig cells in the testes of chickens submitted to early embryonic surgical bursectomy. *J. Anat.* 133: 543-553.
3. Alberola-Ila J., Hogquist K.A., Sevan K.A., Bevan M.J. and Perlmutter R.M. 1996. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J. Exp. Med.* 184: 9-18.
4. Araneo B. and Daynes R. 1995. Dehydroepiandrosterone functions as more than a antiglucocorticoid in preseving immunocompetence after thermal injury. *Endocrinol.* 136 (2): 393-401.
5. Araneo B.A., Ryu Si-Yun, Barton S., Daynes R.A. 1995. Dehydroepiandrosterone reduces progressive dermal ischemia caused by thermal injury. *J. Surgical Res.* 59: 250-262.
6. Ashman R.F., Peckham D. and Stunz L.L. 1996. Regulation of B cell apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406: 145-154.
7. Aspinall R.L. Meyer R.K. and Rao A. 1961. Effects of variuos steroids on the development of bursa Fabricii in chick embryos. *Endocrinol.* 68: 944-949.
8. Baulieu E.E. and Robel P. 1996. Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids. *J. Endocrinol.* 150: S221-S239.
9. Bedrak E., Perek M. and Snapir N. 1971. Evidence for enzymes of steroid metabolism in the bursa of Fabricus. *Comp. Biochem. Physiol.* 38B: 411-423.
10. Besedovsky H. and Sorkin E. 1977. Network of immunoneuroendocrine interaction. *Clin. Exp. Immunol.* 27: 1-12.
11. Betti F., Ulmer Worsmann T., DeFaria F.P. and Sesso A. 1991. Development of the cloacal bursa in the domestic fowl. II A quantitative and fine structural analysis of the follicular cortex and medulla. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23 (4): 613-628.
12. Birkenhänger-Gillesse E.G., Derksen J. and Lagaay A.M. 1994. Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in the oldest ald aged 85 and over Aging clock Series *Annals of New York Series Annals of New York* 719: 543-552.

13. Blauer L. K., Poth M., Rogers M.W. and Bernton W.E. 1991. Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. *Endocrinol.* 129: 3174-3179.
14. Bläuer M. and Tuohimaa P. 1995. Activin β_A - and β_B - subunit expression in the developing chicken bursa of Fabricius. *Endocrinol* 136: 1482-1487.
15. Blythman E.H. and White G.R. 1977. Effect of early bursectomy on germinal centre and immunoglobulin production in chickens. *Immunol.* 33:671-677.
16. Bockman D.E. and Cooper M.D. 1973. Pynocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 136:455-478.
17. Boyd, R.L. and Ward, H.A. 1984. Lymphoid antigenic determinants of the chicken: Ontogeny of bursa-dependent lymphoid tissue. *Dev. Comp. Immunol.* 8:149-167.
18. Boyd R.L., Wilson T.J., Ward H.A. and Mitrangas K. 1990. Phenotypic characterization of chicken bursal stromal elements. *Dev. Immunol.* 1 :41-51.
19. Bracci-Laudiero L., Vigneti E., Iannicola C. and Aloe L. 1993. NGF Retards apoptosis in chick embryo bursal cell *in vitro*. *Diff.* 53 (2): 61
20. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
21. Bradley W.G., Kraus L.A., Good R.A. and Day N.K. 1995. Dehydroepiandrosterone inhibits replications of feline immunodeficiency virus in chronically infected cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46 (1-2): 159-168.
22. Byrd A.J., Hayes K.T., Wright S.M., Dean E.C. and Harges M.B. 1993. Detection and partial characterization of an anti-steroidogenic peptide from the humoral immune system of the chicken. *Life Sciences* 52:1195-1207.
23. Byrd A.J., Dean E.C. and Hargis M.B. 1994. The effects of the humoral immune system-derived bursal anti-steroidogenic prptide (BASP) on corticosteroid biosynthesis in avian, porcine and celine adrenal cortical cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 108 C: 221-227.
24. Byrd A. J., Dean E. C., Fossum W. T and Hargis M.B. 1995. Effect of bursal antisteroidogenic peptide (BASP) on cortisol byosynthesis in ACTH-stimulated canine adrenocortical carcinoma cells *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47: 35-42.

25. Byrd J.A. and Hargis B.M. 1995. Bursal antisteroidogenic peptide alters the activity of steroidogenic enzymes in chicken granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12 (1): 51-61.
26. Caffrey R.E., Kapasi Z.F., Haley S.T., Tew J.G. and Szakal A.R. 1994. DHEAS enhances germinal center responses in old mice. *In Vivo Immunology.*
27. Cohen J.J. 1991. Programmed cell death in the Immune system. *Advances in Immunol.* 50: 55-85.
28. Compton M.M., Gibbs S.P. and Johnson R.L. 1990. Glucocorticoid activation of deoxyribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. *Poultry Sci.* 69 (8): 1292-1298.
29. Cooper M.D., Cain W.A., van Alten P.J. and Good R.A. 1969. Development and function of the immunoglobulin producing system. *Int. Arch. Allergy.* 35: 242-252.
30. Cooper M.D. and Lawton A.R. 1974. The development of immune system. *Sci. Amer.* 231: 58-72.
31. Cortés A., Fonfria J., Vicente A., Varas A., Moreno J. and Zapata G.A. 1995. T-dependent areas in the chicken bursa of Fabricius. An Immunohistological study. *Anat. Rec.* 242: 91-95.
32. Danenberg H.D., Benyehuda A., Zakayrones Z. and Friedman G. 1995. Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment reverses the impaired immune response of old mice to influenza vaccination and protects from influenza infection. *Vaccine* 13 (15): 1445-1448.
33. Daynes R.A., Dudley D.J. and Araneo B.A. 1990a. Regulation of murine lymphokine production *in vivo* II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur. J. Immunol.* 20: 793-802.
34. Daynes A.R., Araneo A.B., Dowell A.T., Huang K. and Dudley D. 1990b. Regulation of murine lymphokine production *in vivo* III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. Exp. Med.* 171: 976-996.
35. Daynes R.A., Araneo B.A., Hennebold J., Enioutina E. and Hong Hua Mu. 1995. Steroids as regulators of mammalian immune response. *J. Invest. Dermatol.* 105: 14S-19S.
36. DeAzevedo R.B. and Betti F. 1993. Increase of the bursal follicular medullary compartment in chicks intracloacally inoculated with *Bordetella pertussis*. *Tissue and Cell* 25 (4): 517-525.

37. Dieter M.P. and Breitenbach R.P. 1970. A comparison of lympholytic effects of corticosterone and testosterone propionate in immature cockerels. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133:357-364.
38. Dolfi A., Lupetti M. and Giannessi F. 1981. Toxic effect of carrageenan on lymphoid-follicle associated epithelial cells of the Bursa of Fabricius of chicken. Cell Tissue Res. 221: 67-75.
39. Dolfi A, Bianchi F., Lupetti M. and Michelucci S. 1989. The significance of intestinal flow in the maturing of B lymphocytes and the chicken antibody response. J. Anat. 166: 233-242.
40. Ebeling P. and Koivisto V.A. 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. Lancet 343:1479-1481.
41. Eerola E., Lasela O., Gilmour D.G. and Toinaven A. 1982. Induction of B cell differentiation *in vitro* bursal epithelium. J Immunol 128 (6): 2652-2655.
42. Ekino S., Matsuno K., Harada S., Fujii H., Nawa Y. and Kotani M. 1979. Amplification of plaque forming cells in the spleen after intracloacal antigen stimulation in neonatal chicken. Immunology 37: 811
43. Ekino S., Suginozawa, K., Urano, T., Fujii, H., Matsumoto, A. and Kotani, M. 1985. The bursa of Fabricius a trapping site for environmental antigens. Immunology 55: 405-410.
44. Ekino S. 1993. Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage. Eur. J. Immunol. 23 (3): 772-775.
45. Ekino S. Riwar B., Kroese F.G.M. Schwander E.H., Koch G. and Nieuwenhuis P. 1995. Role of environmental antigen in the development of IgG⁺ cells in the bursa of Fabricius. J. Immunol. 155:4551- 4558.
46. Evans-Storms B.R. and Cidlowski A.J. 1995. Regulation of apoptosis by steroid hormones. J. Steroid Biochem. Biol. 53 (1-6): 1-8.
47. Ewert D.L., Munchus M.S., Chen C.L.H. and Cooper M.D. 1984. Analysis of structural properties and cellular distribution of avian Ia antigen by using monoclonal antibodies by monomorphic determinants. J. Immunol. 132:2524-2530.
48. Farner D.S. and King J.R. 1973. Avian Biology. Vol III. Academic Press. New York pp 260-262.
49. Frasier A.J. 1974. The ultrastructure of the lymphoid follicles of the chick bursa of Fabricius. Acta Anat. 88:385-397.

50. Funk P.E. and Thompson C.B. 1996. Current concepts in chicken cell development. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 212: 17-36.
51. Gallego M., Del Cacho E., Felias C., C., Varas A. and Bascuas J.A. 1996. Distribution of bursal secretory dendritic cells in the chicken. *Anat. Rec.* 246: 372-376.
52. Gasc J.M. and Sumpf E.W. 1981. The bursa of Fabricius of the chicken embryo: localization and ontogenic evolution of sex-steroid target cells. *J. Embryo Exp. Morph.* 63: 225-231.
53. Gebert A. Rothkötter H-J., Pabst R. 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cytol.* 167: 91-159.
54. Gillermet F.P., Oliver P.D., Peault B.M. and LeDouarin N.M. 1984. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* 160: 1803-1819
55. Gilmore R.S.C. and Bridges J.B. 1977. Studies of the bursa of Fabricius 1. Epithelial bud cell function. (Abstract) *J. Anat.* 124: 247
56. Glick B., Chang T.S. and Taap R.G. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.* 35:224-226.
57. Glick B. 1977. The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis. *Int. Rev. Cytol.* 48:345-402.
58. Glick B. 1980. The thymus and bursa of Fabricius: Endocrine organs? *In Avian Endocrinology.* Academic Press Inc. pp. 209-229.
59. Glick B. 1984. Interrelation of the avian immune and neuroendocrine systems. *J. Exp. Zool.* 232:671-682.
60. Glick B. and Oláh Y. 1993a. A bursal secretory dendritic cell and its contributions to the microenvironment of the developing bursal follicles. *Res. Immunol.* 144: 446-448.
61. Glick B. and Oláh Y. 1993b. Bursal secretory dendritic-like cell a microenvironment issue. *Poultry Sci.* 72: 1262-1266.
62. Glick B. 1995. Embriogenesis of Bursa of Fabricius: Stem cell, microenvironment, and receptor-paracrine pathways *Poultry Sci.* 74: 419-426.
63. Granner D.K. 1992. Hormonas de la corteza suprarrenal. *En Bioquímica de harper.* De. El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. 12ª Edición. 526-539 pp.
64. Griebel P.J. and Hein W.R. 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunology today* 17 (1): 30-39.

65. Hayashi F., Tamura H., Yamada J., Kasai H. and Suga T. 1994. Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone a peroxisome proliferator in male F-344 rats. *Carcinogenesis* 15 (10): 2215-2219.
66. Hemendinger R.A., Putnam J.R., Bloom S.E. 1992. MHC Dosage effects on primary immune organ development in the chicken. *Developmental and Comparative Immunology* 16 (2-3): 175-186.
67. Hennebold, J.D. Daynes R.A. 1994. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinol.* 135:67-75.
68. Hodges R.D. 1974. *The histology of the fowl*. Academic Press. Great Britain. 648 p.
69. Hoshi S., Numoya, T. and Ueda S. 1988. Identification of B-L antigens on reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius. *Microbiol. Immunol.* 32: 173-186.
70. Houssaint E., Belo M. and Le Douarin N.M. 1976. Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Develop. Biol.* 53: 250-264.
71. Houssaint E. Diez E. and Hallet M.M. 1986. The bursal microenvironment phenotypic characterization of the epithelial component of the epithelial component of the bursa of Fabricius with the use of monoclonal antibodies. *Immunol.* 58:43
72. Houssaint, E. 1987. Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *J. Immunol.* 138: 3626-3634.
73. Houssaint, E., Diez, E. and Pink, J.R.L. 1987. Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen. *Immunology* 62:463-470.
74. Jacobsen K.A., Paramiothiotis E., Ewert D.L. and Ratcliffe M.J.H. 1996. Apoptotic cell death in the chicken bursa of Fabricius. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406:155- 165.
75. Jacobson A.M. Fusaro E.R., Galmarini M. and Lang W. 1991. Decreased serum dehydroepiandrosterone is associated with an increased progression of human immunodeficiency virus infection in men with CD4 cell counts of 200-499. *J. infections Diseases* 164: 864-868.
76. Jalkanen S., Granfors K., Jalkanen M. and Toivanen P. 1983. Immune capacity of chicken of bursectomized at 60h of incubation. Surface immunoglobulin and B-L (Ia-like) antigen bearing cells. *J. Immunol.* 130: 2038-2041.
77. Jankovic B.D., Isakovic K., Markovic B.M., Rajcevic M. and Knezevic Z. 1976. Nonbursal origin of humoral immunity: Immune capacity and cytomorphological changes in chickens bursectomized as 52-64h old embryos. *Exp. Hematol.* 4: 246-255.

78. Jankovic B.D., Isakovic K., Markovic B.M. and Rajcevic M. 1977. Immunological capacity of the chicken embryo. II. Humoral immune responses in embryos and young chickens bursectomized at 52-64h of incubation. *Immunology* 32: 689-699.
79. Kalimi M. and Regelson W. 1988. Physicochemical characteristics of [³H] DHEA binding in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 156: 22-29.
80. Kawai S., Yahata N., Nishida S., Nagai K. and Mizushima Y. 1995. Dehydroepiandrosterone inhibits B16 mouse melanoma cell by induction of differentiation. *Anticancer Res.* 15 (2): 427-431.
81. Khan M.Z.I. and Hashimoto Y. 1996. An immunohistochemical analysis of T-cell subsets in the chicken bursa of Fabricius during postnatal stages of development. *J. Vet. Med. Sci.* 58 (12): 1231-1234.
82. Kim H.R., Ryu S.Y., Kim H.S., Choi B.M., Lee E.J., Kim H.M. and Chung H.T. 1995. Administration of dehydroepiandrosterone reverses the immune suppression induced by high dose antigen in mice. *Immunol. Invest.* 24 (4): 583-593.
83. Knobil E. and Neill D.J. 1994. *The physiology of reproduction. Second Edition.* Raven Press. New York pp. 571-580.
84. Lantos P.C. y Gros G.E. 1985. Estructura y función de las hormonas esteroideas. 20-38 pp. Sección 1. *Endocrinología Molecular.* Eds. Calandra S. R. y DeNicola F.A. El Ateneo. Buenos Aires 471p
85. Lassila O., Eskola J. and Toivanen P. 1979. Prebursal stem cells in the intraembryonic mesenchyme at 7 days of incubation. *J. Immunol.* 123: 2091-2094.
86. Le Douarin N.M. Michel G. and Baulieu E.E. 1980. Studies of testosterone-induced involution of the bursa of Fabricius. *Dev. Biol.* 75: 288-302.
87. Loria R.M., Inge T.H., Cook S., Szakai A. and Regelson W. 1988. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Med. Virol.* 26: 301-314.
88. Loria R.M., Padgett D.A. and Huynh P.N. 1996. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *J. Endocrinol.* 150: S129-S147.
89. Lupetti M. and Dolfi A. 1980. Concerning bidirectional transport by the lymphoid follicle-associated epithelial cells. *Cell. Molec. Biol.* 26:609-613.
90. Lupetti M., Dolfi A. and Michelucci S. 1983. The behavior of bursal lymphoid associated cell after treatment with testosterone. *Anat. Rec.* 205:177-183.

91. Lupetti, M., Dolfi A., Giannessi F. and Michelucci. 1983. Ultrastructural aspects of the lymphoid follicle associated cells of the cloacal bursa after treatment with silica or carrageenan. *J. Anat.* 136 (4): 851-862.
92. Luppetti M., Dolfi A., Malatesta T. and Giannessi F. 1984. On the role of the lymphoid follicle-associated areas in the organization of the bursal follicle in the cloacal bursa in birds. *Anat. Anz. Jena.* 157: 291-297.
93. Lupetti M., Dolfi A., Giannessi F., Bianchi F. and Michelucci S. 1990. Reappraisal of histogenesis in the bursal lymphoid follicle of the bursal lymphoid follicle of the chicken. *Am. J. Anat.* 187:287-302.
94. Lydyard P.M., Grossi C.E. and Cooper M.D. 1976. Ontogeny of B cells in the chicken. V. Sequential development of clonal diversity in the bursa. *J. Exp. Med.* 144: 79-97.
95. Mansikka A., Sandberg M., Lassila O. and Toivanen P. 1990. Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9416-9420.
96. Marsh J. and Glick B. 1992. The effect of cyclophosphamide on bursal and splenic cells. *Poult. Sci.* 71: 113-119.
97. Masteller E.L., Larsen R.D., Carlson L.M., Pickel J.M., Nickoloff B., Lowe J., Thompson C.B. and Lee K.P. 1995. Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development.* 121 (6): 1657-1667.
98. McComack T.W. and Thompson B.C. 1990. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light-chain gene. *Advances Immunol.*
99. McCormack T.W., Tjoelker W.L. and Thompson B.C. 1991. Avian B-cell development generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Ann. Rev. Immunol.* 9:
100. McGimsey W.C., Cidlowski J.A., Stumpf W.E., Sar M. 1991. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in rat brain, pituitary, liver and thymus with two new polyclonal antipeptide antibodies. *Endocrinol.* 129 (6): 3064-3072.
101. Meikle A.W., Dorchuck R.W., Araneo B.A., Stringham D.J., Evans T.G., Spruance S.L. and Daynes R.A. 1992. The presence of dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 42 (3-4): 293-304.
102. Menotetang G.M.L., Hn Y.Y. and Jusko W.J. 1996. Synergistic interaction between dehydroepiandrosterone and prednisolone in the inhibition of rat lymphocyte proliferation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 18 (3): 443-456.

103. Meyer R.L., Rao M.A. and Aspinall R.L. 1959. Inhibition of development of the bursa of Fabricius in the embryos of common fowl by 19 nor-testosterone. *Endocrinol.* 64:890-898.
104. Miller L. and Hunt J.S. 1996. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences.* 59 (1): 1-14.
105. Moriya O. and Ichikawa Y. 1979. Ontogeny spontaneous antigen-binding cells in developing chick embryos. *Immunology* 37: 857-861.
106. Moriya O. 1995. Ultrastructural localizations of J chains in the chicken bursa of Fabricius at different stages of development. *Acta Histochemica* 97 (3): 333-342.
107. Moser M., DeSmedt T., Sormasse T., Tielemans F., Chentoufi A.A., Muraille E., Van Mechelen M., Urbain J. and Leo O. 1995. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 25: 2818-2824.
108. Moticka J.E. 1975 Development of immunological competence in chicken. *Amer. Zool.* 15:135-146.
109. Moticka E.J. 1977. The presence of immunoregulatory cells in chicken thymus: functions in B and T cell responses. *J. Immunol.* 19: 987-992.
110. Motyka B. and Reynolds J.D. 1991. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius: a possible role in B cell selection. *Eur J. Immunol.* 21: 1951-1958.
111. Motyka B., Bhogal S.H. and Reynolds D.J. 1995. Apoptosis of ileal Peyer's patch B cells is increased by glucocorticoids or anti-immunoglobulin antibodies. *Eur. J. Immunol.* 25: 1865-1871.
112. Naukkarinen A., Arstilla A.U. and Sorvari T.E. 1978. Morphological and functional differentiation of surface epithelium of the bursa Fabricii in chicken. *Anat. Rec.* 191: 415-432.
113. Naukkarinen, A. and Sorvari, T.E. 1982. Cellular transport of colloidal carbon in the follicle-associated epithelium of the chicken bursa of Fabricius. *J. Ret. Soc.* 28:473-482.
114. Naukkarinen A. and Sorvari T.E. 1984. Involution of the chicken bursa of Fabricius. A light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. *J. Leukocyte Biol.* 35:281-290.
115. Neiman P.E., Thomas S.J. and Loring G. 1991. Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5857-5861.

116. Neiman P.E. Blish C., Heydt C. Loring G. Thomas SJ. 1994. Loss of cell cycle controls in apoptotic lymphoblast of bursa of Fabricius. *Mol. Biol. Cell* 5: 763-772.
117. Neutra M.R., Pringault E. and Kraehenbuhl J.P. 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 275-300.
118. Niedorf H.R. and Wolters B. 1974. Feinstrukturelle Untersuchungen an den Makrophagen der Bursa Fabricii des Hühnchens. *Betr. Path Bd.* 151: 75-86.
119. Norris D.O. 1985. *Vertebrate Endocrinology. USA.* Lea & Febiger. 493p.
120. Norton J.M. and Wira C.R. 1977. Dose-related effects of the sex hormones and cortisol the growth of the bursa of Fabricius in chick embryo. *J. Steroid Biochem.* 8:985-987.
121. Nossal G.J.V. 1996. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229-239.
122. Okabe T., Haji M., Takayanagi R., Adachi M., Imasaki K., Kurimoto F., Watanabe T. and Nawata H. 1995. Up-regulation of high affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2993-2996.
123. Oláh I. and Glick B. 1978a. Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia*, 34:1642-1643.
124. Oláh I. and Glick B. 1978b. The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* 57: 1451-1455.
125. Oláh I. and Glick B. 1986. Effect of carrageenan on the histology of the bursa of Fabricius and the humoral immune response to *Salmonella* O antigen. *Anat. Rec.* 214:398-404.
126. Oláh I. and Glick B. 1987. Bursal secretory cells. An electron microscope study. *Anat. Rec.* 219:268-274.
127. Oláh I. and Glick B. 1992a. Follicle associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartment. *Anat. Rec.* 233 (4): 577-587.
128. Oláh I. and Glick B. 1992b. Dynamic changes in the intermediate filaments of the epithelial cells during development of the chicken's bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* 71 (11): 1857-1872.
129. Oláh Y. and Glick B. 1995. Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat. Rec.* 243: 384-389.

130. Oliver P.D. and LeDouarin N.M. 1984. Avian thymic accessory cells. *J. Immunol.* 132 (4): 1748-1755.
131. Osborne B.A. 1995. Induction of genes during apoptosis: Examples from immune system. *Seminars in Cancer Biology* 6 (1): 27-33.
132. Owen L.R. and Ermak H.T. 1990. Structural specializations for antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer Semin. Immunopathol.* 12:139-152.
133. Padgett D.A. and Loria R.M. 1994. In vitro potentiation of lymphocyte activation by dehydroepiandrosterone, androstenediol and androstenediol. *J. Immunol.* 153: 1544-1552.
134. Pahlavani M.A. and Harris M.D. 1995. Effect of dehydroepiandrosterone on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine production in young and old F344 rats. *Immunol. Letters* 47: 9-14
135. Pahlavani M.A. and Harris M.D. 1995. Effect of dehydroepiandrosterone on mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine production in young and old F344 rats. *Immunol. Letters* 47: 9-14.
136. Palojoki E., Toivanen P. and Jalkanen S. 1993. Chicken B cells adhere to the CS-1 site of fibronectin throughout their bursal and postbursal development. *Eur. J. Immunol.* 23 (3): 721-726.
137. Paniagua R. y Nistal M. 1983. Introducción a la histología animal comparada. España. Labor 438 p.
138. Paramithiotis E., Jacobsen A.K. and Ratcliffe H.J. 1995. Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in of Bursa of Fabricius. *J. Exp. Med.* 181: 105-113.
139. Pedernera A.E., Romano M., Besedovsky O.H. and Aguilar M.C. 1980a. The bursa of Fabricius is required for normal endocrine development in chicken. *Gen Comp. Endocrinol.* 42: 413-419.
140. Pedernera E.A., Romano M. and Aguilar M.C. 1980b. Influence of early surgical bursectomy on Leydig cells in the chick embryo testes. *J. Steroid Biochem.*, 12: 517-519.
141. Pedernera E., Aguilar M.C. and Romano M. 1985. A factor from bursa of Fabricius inhibits *in vitro* the chorionic gonadotropin response of the chick testis. *Gen. Comp. Endocr.* 57: 124-129.
142. Pink J.R.L. Vainio O. and Rijnbeek A-M. 1985. Clones of lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius. *Eur. J. Immunol.* 15: 83-87.

143. Pink J.R.L. and Lassila A. 1987. B cell commitment and diversification in the bursa of Fabricius. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 135:57-64.
144. Ram P.A. and Waxman D.J. 1994. Dehydroepiandrosterone 3 beta-sulfate is an endogenous activator of the peroxisome-proliferation pathway: Induction of cytochrome P-450 4A and acyl-CoA oxidase mRNA in primary rat hepatocyte culture and inhibitory effects of Ca²⁺-channel blockers. *Biochemical J.* 301 (Part 3): 753-758.
145. Rao S.M. Reid B., Ide H. Subbarao V. and Reddy J.K. (1994) Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat: evolution of sex differences (43805). *PSEBM* 207:186-190.
146. Rasmussen K.R., Healey M.C., Cheng L. and Yang S. 1995. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 81 (3): 429-433.
147. Ratcliffe M.J.H. 1985. The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. *Immunol. today* 6 (7): 223-227.
148. Regelson W. and Kalimi M. 1994. Dehydroepiandrosterone (DHEA) the multifunctional steroid. II Effects on the CNS cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects, mechanism of action? *Aging clock. Aging clock Series Annals of New York Series Annals of New York* 719:564-575.
149. Regelson W., Loria R. and Kalimi M. 1994. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-the "mother steroid". I Immunologic action *Aging clock. Aging clock Series Annals of New York Series Annals of New York* 719: 553-563.
150. Reynaud C.A., Bertocci B., Dahan A. and Weill J.C. 1994. Formation of the chicken B-cell repertoire. Ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement and diversification by gene conversion. *Advances in Immunology.* 57: 353-378.
151. Robel P., Akwa Y., Copéchet C., Hu Z.Y., Jung-Testas Y., Kabbadj K., Le Goascogne C., Morfin R., Vourc'h C., Young J. and Baulieu E.E. 1991. Neurosteroids: Biosynthesis and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *In Brain Endocrinology. Second Edition.* Eds. Marcela Motta. Raven Press. New York pp. 105-132.
152. Romppanen T. 1982. Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. *Poultry Sci.* 61: 2261-2270.
153. Rook W.A.G., Hernández-Pando R. and Lightman L.S. 1994. Hormones peripherally activated prohormones and regulation of the Th1/Th2 balance. *Immunol. today* 15 (7): 301-303.

154. Rubio Ledesma M.E. 1992. Absorción de la dehidroepiandrosterona a través del cascarón de huevo de gallina durante la incubación. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. México D.F.
155. Santisteban A.G. 1960. The growth and evolution of lymphatic tissue and its interrelationships to aging and growth of adrenal glands and sex organs in CBA mice. *Anat. Rec.* 136: 117-126.
156. Santoianni P. and Ayala M. 1965. Fluorometric ultramicroanalysis of deoxiribonucleic acid in human skin. *J. Inv. Dermatology* 45 (2): 99-103.
157. Sarthou P., Benhamou L. and Cazenave P-A. 1996. B cell activation and apoptosis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 200: 15-37.
158. Schaffner T. Mueller J. Hess W. M., Cottier H., Sodat B. and Ropke C. 1974. The bursa of Fabricius: A central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content. *Cell Immunol.* 13: 304-312.
159. Schumburg B.P. and Crone M. 1971. Binding of corticosterone by thymus cells bursa cells and blood lymphocytes from the chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 237: 494-501.
160. Schwartz A.G. and Pashko L.L. 1995. Cancer prevention with dehydroepiandrosterone and non-androgenic structural analogs. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 22: 210-217.
161. Shiojiri N. and Takahashi M. 1991. Lymphoid follicle formation in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *J. Anat.* 175: 237-249.
162. Simard J., Durocher F., Mebarki F., Turgeon C., Sánchez R., Labrie Y., Couet J., Trudel C., Rheáume E., Morel y., Luu-The V. and Labrie F. 1996 Molecular biology and genetics of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase / Δ^5 y Δ^4 isomerase gene family. *J. Endocrinol.* 150: S189-S207.
163. Sorvari T., Sorvari R., Toivanen R.A. and Toivanen P. 1975. Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius. *Nature* 253: 217-219.
164. Sorvari R. and Sorvari E.T. 1977. Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the reference to its immunological importance. *Immunol.* 32:499-505.
165. Sullivan A.D. and Wira R.C. 1979. Sex hormone and glucocorticoid receptors in the bursa of Fabricius of immature chicks. *J. Immunol.* 122 (6): 2617-2623.

166. Szenberg A. 1976. Ontogenesis of the immune system in birds. *In* Comparative Immunology. Eds. Marchalonis J.J. Blacwell Scientific Publications. Great Britian. 470 p.
167. Toivanen P. and Toivanen A. 1973. Bursal and postbursal stem cells in the chicken: Functional characteristics. *Eur. J. Immunol.* 3: 585-595.
168. Valle L.D., Couet J., Labrie Y., Simard J., Belvedere P., Simontacchi C., Labrie F. and Colombo L. 1995. Occurrence of cytochrome P450c17 mRNA and dehydroepiandrosterone biosynthesis in the rat gastrointestinal tract. *Mol. Cell. Endocrinol.* 111: 83-92.
169. Van Alten P.J. and Meuwissen H.J. 1972. Production specific antibody by lymphocytes of the bursa of Fabricius. *Science* 176: 45-47.
170. Verheul H.A.M., Tittes E.V., Kelder J. and Schwurs A.H.W.M. 1986. Effects of steroids with different endocrine profiles on the development, morphology and function of bursa of Fabricius in chickens. *J. Steroid Biochem.* 25 (5A): 665-675.
171. vonBoehmer H. 1994. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76: 219-228.
172. Weill J.C. and Reynaud C.A. 1987. The chicken B cell compartment *Science* 238: 1094-1098.
173. Weill J.C. Leibowitch M. and Reynaud C.A. 1987. Questioning the role of the embryonic bursa in the molecular differentiation of B lymphocytes. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 135: 111-124.
174. Weksler M.E. 1993. Immune senescence and adrenal steroids: Immune dysregulation and the action of dehydroepiandrosterone (DHEA) in old animals. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 45 Supple 1: S21-S23; discussion S43-S44.
175. Wilson T.J. and Boyd L.R. 1990. The ontogeny of chicken bursal stromal cells defined by monoclonal antibodies. *Dev. Immunol.* 1: 31-39.
176. Ylikomi T., Gasc J.M., Isola J., Baulieu E.E. and Tuohimaa P. 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of Fabricius: Characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinol.* 117: 155-160.
177. Ylikomi J.T. Isola J.J. Velja J.P. and Tuohimaa P. 1987a. Characterization of estrogen sensitive cells expressing progesterone receptor in the bursa of Fabricius. *Mol. Cell. Endocrinol.* 52:35-42.
178. Ylikomi J.T., Isola J.J., Gasc J.M. and Tuohimaa J.P. 1987b. Sexual maturation-associated and estrogen-induced progesterone receptor expression in the bursa of Fabricius. *J. Immunol.* 138 (19):3174-3178.

179. Ylikomi T. and Tuohimaa P. 1989. Sex steroid sensitivity of developing bursa Fabricius. *Int. J. Dev. Biol.* 33: 135-140.
180. Zapata A.G. and Cooper E.L. 1990. The bursa of Fabricius *In* The Immune system. *Comparative histophysiology.* John Wileyand Sons. Great Britian. 335 p.