

01682



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**OBTENCIÓN DE IFN $\gamma$  RECOMBINANTE DE POLLO Y SU PAPEL  
IN VITRO EN LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS DE POLLO  
INFECTADOS CON *Salmonella gallinarum***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**(ÁREA: INMUNOLOGÍA)**

**PRESENTADA POR:**

**GARY GARCÍA ESPINOSA**

**TUTORES**

**DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS**

**DR. VIANNEY FCO. ORTÍZ NAVARRETE**



**ABRIL, 2000**

279232.



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

---

DECLARACIÓN.....	I
COMITÉ TUTORAL Y JURADO.....	II
DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
METODOLOGÍA.....	12
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS.....	47
LITERATURA CITADA.....	49

## DECLARACIÓN

---

Doy mi consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario, siempre y cuando se otorgue el crédito al Autor y a la Institución.



---

GARY GARCÍA ESPINOSA

## **COMITÉ TUTORAL Y JURADO**

---

**DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO  
PRESIDENTE**

**DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO  
SECRETARIO**

**DR. CÉSAR RAÚL GONZALEZ BONILLA  
VOCAL**

**DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA  
VOCAL**

**DR. MICHAEL HENRI KOGUT  
VOCAL**

**DR. VIANNEY FCO. ORTIZ NAVARRETE  
SUPLENTE**

**DR. GUILLERMO TÉLLES ISAÍAS  
SUPLENTE**

## DEDICATORIAS

---

A DIOS POR DARME LA OPORTUNIDAD DE ESTAR EN EL CAMINO DE LA CIENCIA Y ENSEÑARME A SER HUMILDE HACIA EL CONOCIMIENTO,  
GRACIAS

A MI ESPOSA ODILIA S. SANTIBAÑEZ FLORES, POR LLEGAR EN EL MOMENTO JUSTO PARA BALANCEAR MI VIDA E INCREMENTAR TODO MI POTENCIAL HUMANO BAJO CUALQUIER CIRCUNSTANCIA.

TAMALITOS

A MIS PADRES *LUCIANO GARCÍA GARCÍA* Y *GRACIELA ESPINOSA JUAREZ*, POR TODOS LOS CONSEJOS Y APOYO NECESARIOS PARA SOBREVIVIR DENTRO DE LA DECADENTE SOCIEDAD HUMANA.

MIL GRACIAS

A MI COMITÉ TUTORAL Y JURADO POR DEDICAR 4 AÑOS DE SU TIEMPO PARA ENSEÑARME Y REVISAR MI FORMACIÓN EN EL CAMINO DE LA CIENCIA.

GRACIAS

**AGRADECIMIENTOS AL FINANCIAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE  
INVESTIGACIÓN DE LOS DRS**

---

VIANNEY FCO. ORTÍZ NAVARRETE  
ARMANDO ISIBASI ARAUJO  
CÉSAR RAÚL GONZALEZ BONILLA  
LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

**AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

---

AL DR. J.M. SHARMA  
AL BANCO DE HIBRIDOMAS DE LA UNIVERSIDAD DE ALABAMA

**AGRADECIMIENTOS**

---

AL PROGRAMA DE APOYO A ESTUDIOS DE POSGRADO (PAEP), CON NÚMERO 016003 (1997) y 009007 (1998). PARA LA ADQUISICIÓN DE EQUIPO Y REACTIVOS.

AL PROGRAMA DE APOYO A ESTUDIOS DE POSGRADO PARA TESIS DOCTORAL (PAEP), CON NÚMERO 009307 (1998). PARA LA ADQUISICIÓN DE EQUIPO Y REACTIVOS.

AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), CON NÚMERO IN207797 (1998-1999). PARA LA ADQUISICIÓN DE EQUIPO Y REACTIVOS.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL POSGRADO POR SU APOYO MORAL  
E INTELLECTUAL**

---

Anahí, Araceli, Gaby, M<sup>a</sup> Teresa, Natalia, Norma, Penelope, Rebeca, Rosana, Rosa M<sup>a</sup>, Sara, Tony, Alberto, Fernando, Mario, Manuel, Roberto y Víctor.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL DEPTO: AVES POR SU APOYO  
TÉCNICO**

---

Lilia Castellanos, Daniel Ortega, José Jesús Cabriaes, Nestor Ledezma, Juan Merino, Rodrigo Merino, Adelfo Juárez



## RESUMEN

El IFN $\gamma$  tiene un papel esencial en la resistencia del huésped del mamífero ante las infecciones por microorganismos intracelulares. Este papel se lleva a cabo a través de la activación de los mecanismos microbicidas de las células fagocíticas profesionales como el macrófago. En otras especies como los pollos (*Gallus gallus*), ya se ha descrito la producción de esta molécula por las células T y algunas de sus actividades biológicas *in vitro* en los macrófagos, como es la regulación del aumento de las moléculas del MHC clase I y II, y la producción de óxido nítrico, así como su actividad antiviral vs virus no específicos para el género *Gallus gallus* y la inhibición de la multiplicación de *Eimeria tenella* en fibroblastos de embrión de pollo. Sin embargo, aun no se ha descrito su participación en el control de la multiplicación de otros microorganismos intracelulares. Para determinar su participación en los pollos, en este estudio se clonó y expresó en forma recombinante el IFN $\gamma$  de pollo y se evaluó su participación para aumentar la actividad microbicida del macrófago HD11 de pollo hacia la cepa silvestre virulenta de *Salmonella gallinarum*. Los estudios revelaron que los macrófagos en reposo permiten una limitada multiplicación y supervivencia de la bacteria intracelular y su activación previa por IFN $\gamma$  abate la multiplicación y disminuye la supervivencia de la bacteria. Estos resultados indican que la molécula de IFN $\gamma$  de pollo, es una proteína clave en la destrucción de microorganismos intracelulares en los pollos y una molécula relevante en la defensa hacia los microorganismos intracelulares en las diferentes especies animales.

## SUMMARY

IFN $\gamma$  has an essential role in the resistance of mammalian host to intracellular microorganisms. This role is through the activation of microbicidal activities into professional phagocyte cells like macrophage. In other species such as chickens (*Gallus gallus*), this molecule is produced by T cells and some biological activities have been described *in vitro* with macrophages as the upregulation of MHC molecules class I and II and stimulation to produce nitric oxide. In other kinds of cells like chicken embryonic fibroblasts, IFN $\gamma$  induces the antiviral activity against viruses not specific for chickens and decreases the multiplication of *Eimeria tenella*. However, it is not known yet its role against multiplication of other intracellular microorganisms. To focus this topic in chickens we cloned and expressed recombinant chicken IFN $\gamma$  and studied its role to activate microbicidal activities into macrophage cell line HD11 infected with wild type *Salmonella gallinarum*. The results show that rested macrophages allow a limited multiplication and survival of intracellular bacterium and its previous stimulation with IFN $\gamma$  breaks multiplication and decreases survival of the bacterium. These results indicate that chicken IFN $\gamma$  is a key molecule to kill intracellular microorganisms in chickens and relevant to defense in different hosts against intracellular microorganisms.

## INTRODUCCIÓN

### El IFN $\gamma$ de especies mamíferas.

En el ratón, la molécula de IFN $\gamma$  es sintetizada por las células T (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. 1989) y células NK (Arase, H. *et al* 1996) en forma de un monómero de 17 kDa. Una vez secretada, adquiere una forma homodimérica que se une a su receptor específico de membrana del tipo II (Figura 1).

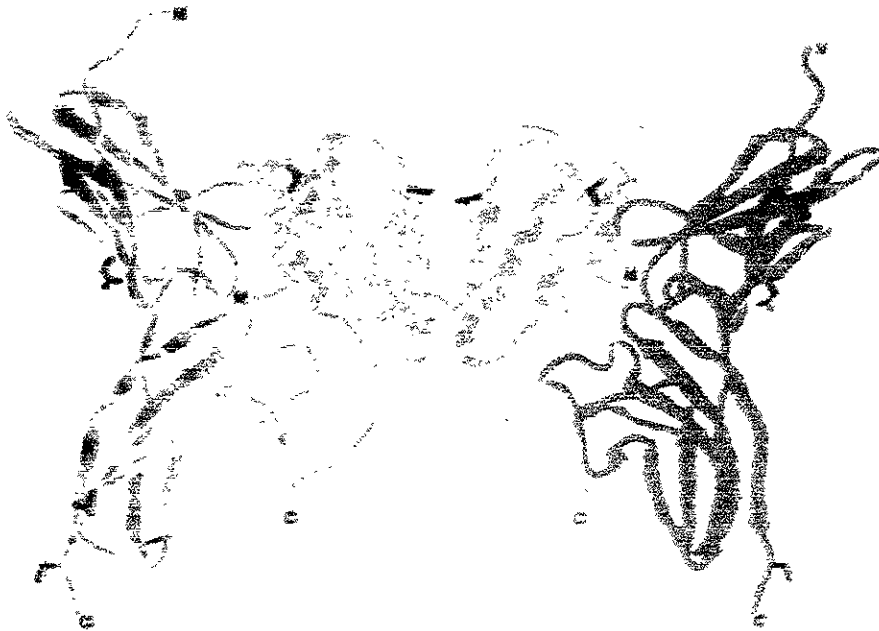


Figura 1. Estructura cristalográfica de la unión entre el IFN $\gamma$  y el dominio celular de la cadena  $\alpha$  soluble del receptor de IFN $\gamma$ . Los dos monómeros están en color azul y magenta. Cada monómero del IFN $\gamma$  se une a un receptor soluble que está en color amarillo y verde, por lo que una molécula homodimérica de IFN $\gamma$  dimeriza la cadena  $\alpha$  del receptor de IFN $\gamma$ . La predicción de la ubicación de la membrana celular está por debajo de la página.

Fotografía de Walter, M.R., Windsor, W.T., Nagabhushan, T.L., Lundell, D.J., Lunn, C.A., Zauodny, P.J., Narula, S.W., 1995. Crystal structure of a complex between interferon- $\gamma$  and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 376:230-235

Traduce señales intracelulares a través de las cinasas Janus (Jaks, por sus siglas en Inglés) y por la molécula homodimérica responsable de la traducción de la señal y de la activación de la transcripción (Stat, por sus siglas en Inglés) que dan inicio a la transcripción de genes que estén bajo la secuencia de activación de gamma (GAS, por sus siglas en Inglés) y de la secuencia de los elementos de respuesta al interferón (ISRE, por sus siglas en Inglés). Las funciones biológicas que resultan de la interacción ligando receptor tienen un impacto relevante en la defensa del huésped ante las infecciones por microorganismos intracelulares. La razón de ésta importante característica biológica del IFN $\gamma$  tiene como base principal la activación de los mecanismos responsables de la destrucción, el procesamiento y la presentación del antígeno.

### **Efectos biológicos por el IFN $\gamma$ en los macrófagos en especies mamíferas.**

***Destrucción del microorganismo.*** El macrófago ha sido la célula fagocítica profesional más estudiada por ser una de las células donde hay supervivencia y multiplicación de los microorganismos intracelulares. La activación de éstas células por el IFN $\gamma$  induce dos importantes mecanismos efectores:

1. *La producción de metabolitos intermediarios reactivos del O<sub>2</sub>.* El mecanismo dependiente de O<sub>2</sub>, se inicia por que el IFN $\gamma$  promueve el ensamble del complejo enzimático de la oxidasa dependiente de la nicotina adenina dinucleótido fosfato hidrogenado (NADPH, por sus siglas en Inglés) que posteriormente se une a la cadena de transporte de electrones asociada a la membrana llamado citocromo b558 (Cassatella, M.A., *et al*, 1989; Cassatella, M.A., *et al*, 1990), la cual reduce el O<sub>2</sub> en anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que es un radical altamente tóxico que a su vez contribuye al inicio de la cascada enzimática productora de otros reactivos intermediarios tóxicos como son el peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y radicales hidroxilo que son agentes germicidas (Boehm, U., *et al*, 1997).

2. *La producción de metabolitos intermediarios reactivos del N.* El mecanismo dependiente de N, se inicia por la enzima óxido nítrico sintasa (NOs, por sus siglas en Inglés) de la cual se conocen 2 isoformas constitutivas (cNO2, por sus siglas en Inglés, también llamadas NOS1) y una inducible (iNOs, por sus siglas en Inglés, también llamada NOS2). El IFN $\gamma$  induce la síntesis de *novo* de la enzima iNOs que cataliza el aminoácido L-arginina + O<sub>2</sub> a N-OH-L-arginina, y éste a su vez + O<sub>2</sub> da origen a la L-citulina y óxido nítrico (ON) (Xie, Q.W., *et al*, 1992; Bredt, D.S., *et al*, 1991). El ON como el O<sub>2</sub><sup>-</sup> participa en la cascada precursora de otros agentes reactivos intermediarios como son el dióxido de nitrógeno, nitrito, nitrato, peroxinitrito y radicales hidroxilo que son altamente tóxicos y antimicrobianos (MacMicking, J., *et al*, 1997).

Sin embargo, se requiere la participación conjunta de otros mecanismos llamados independientes del O<sub>2</sub> y N, que se basan en la actividad de diferentes proteínas contenidas en los lisosomas, como son las enzimas hidrolasas ácidas (Bainton, D. 1981); los péptidos catiónicos y las defensinas. Sin embargo, son pocos los reportes que evidencian la regulación de alguna de estas proteínas por acción directa del IFN $\gamma$ , una de ellas es la ubiquidina (Hiemstra, P.S., *et al*, 1999) y la enzima reductora de los puentes disulfuro (Arunachlam, B., *et al*, 2000), y prácticamente ningún estudio que demuestre la regulación de estos mecanismos por IFN $\gamma$ .

**Regulación del procesamiento y presentación del antígeno.** El IFN $\gamma$  es una molécula que regula la elevación de varias proteínas que participan a diferentes niveles en el procesamiento y la presentación del antígeno a células T (Tabla 1 y 2). La regulación de la elevación de estas moléculas que se encuentran codificadas dentro ó no del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en Inglés) tiene una integración funcional compleja.

Tabla 1. Moléculas participantes en la presentación del antígeno restringido por la molécula del MHC clase I, que su aumento es regulado por IFN $\gamma$ .

<b>Clase I clásica</b>
HLA.A (Humano)
HLA.B
HLA.C
H-2K (Ratón)
H-2D
H-2L
$\beta_2$ microglobulina (Humano y ratón)
<b>Moléculas accesorias de clase I. (Transportadores de péptidos al retículo endoplásmico)</b>
TAP1
TAP2
<b>(Subunidades <math>\beta</math> del proteasoma)</b>
LMP2
LMP7
LMP10
<b>(Moléculas reguladoras del proteasoma)</b>
PA28 $\alpha$
PA28 $\beta$
Antígeno Ki
<b>(Moléculas chaperonas)</b>
Tapasina
Gp96

Tabla 2. Moléculas participantes en la presentación del antígeno restringido por la molécula del MHC clase II, que su aumento es regulado por IFN $\gamma$ .

<b>Clase II clásica</b>
HLA-DP (Humano)
HLA-DQ
HLA-DR
H-2.A (Ratón)
H-2.E
<b>Proteínas accesorias</b>
Proteasa ácida
Cadena invariante (ii)
DMA
DMB
<b>Factor de transcripción</b>
CIITA
RFX5

**Por Clase I.** La molécula de clase I, es una proteína que se expresa de manera constitutiva en la membrana de todos los diferentes tipos celulares del organismo, pero que su nivel de expresión varía dependiendo del fenotipo celular. La estimulación de cualquier fenotipo celular por IFN $\gamma$ , eleva el nivel de expresión de la molécula, siendo esto mayor en aquellas células con baja expresión. Esta regulación por el IFN $\gamma$ , obedece a la interacción del Stat con la secuencia blanco ISRE del ADN que inicia la transcripción de varios factores transcripcionales como el factor regulador de interferón tipo 1 (IRF-1, por sus siglas en Inglés) que ha sido el más estudiado e involucrado. Sin embargo, el ISRE no es una secuencia de respuesta exclusiva del IFN $\gamma$ , ya que el IFN tipo I, también la utiliza para elevar esta molécula, de esta manera la regulación de la molécula clase I obedece a la acción de ambos interferones. Sin embargo, este efecto biológico, puede ser

aumentado por la participación de estímulos sinérgicos como son el factor transcripcional NF- $\kappa$ B inducido por la vía del TNF $\alpha$ , en donde este factor se une a la secuencia de ADN que regula el aumento del promotor (enhancer, por su nombre en Inglés) del gene de la molécula de clase I (enhancer A), dando lugar a una mayor transcripción (Boehm, U., *et al*, 1997), otro estímulo sinérgico es la acción del lipopolisacárido (LPS), a través de la rápida fosforilación que induce en la serina 727 del Stat-1 dentro de la vía de señalización del IFN $\gamma$  (Kovarik, P., *et al*, 1998).

La regulación del aumento de la molécula de clase I por IFN $\gamma$ , es solo el evento final de una serie de mecanismos regulados por él, para dar inicio a la citotoxicidad. Ya que el impacto biológico por parte del IFN $\gamma$  en la regulación de la presentación del antígeno comienza desde el aumento de las proteínas asociadas a la transportación (TAP, por sus siglas en Inglés) y el cambio de sus tres subunidades  $\beta$  que modifican el corte proteolítico para dar la preferencia a la generación de péptidos óptimos a partir de los polipéptidos; también regula el aumento de la subunidad PA28 $\alpha$  y  $\beta$  del activador del proteasoma para aumentar la eficiencia del corte del proteasoma; así como a la molécula chaperona Gp96 necesaria para la retención de los péptidos en ese organelo; regula la síntesis de la cadena transmembranal  $\alpha$  de la molécula de clase I, a la molécula soluble  $\beta_2$  microglobulina y a la molécula chaperona gp48 (tapasina) necesarias para el ensamble y mantenimiento de la conformación de la molécula de clase I, que son necesarios finalmente para permitir la unión de los péptidos generados al sitio de anclaje de la molécula de clase I y su posterior presentación al receptor de la célula T CD8 $^+$ .

**Por Clase II.** La molécula de clase II, es una molécula constitutiva de la membrana que esta restringida a las células profesionales en presentación de antígeno como los macrófagos, células dendríticas y las células B activadas, aunque se puede inducir por IFN $\gamma$  en otros fenotipos celulares como las células



epiteliales y los linfocitos T. La regulación de su aumento esta dada por el factor de transcripción de clase II (CIITA, por sus siglas en Inglés) y el factor de unión a la caja E (RFX5, por sus siglas en Inglés) que son inducidos por IFN $\gamma$  a través de la unión de STAT1/USF-1 a la secuencia GAS y caja E (E-Box, por sus siglas en Inglés) (Boehm, U., *et al*, 1997; Muhlethaler-Mottet, A., *et al*, 1998). A diferencia de clase I, solamente el IFN $\gamma$  regula la elevación de clase II. Sin embargo, también existen estímulos sinérgicos que aumentan más esta molécula, tal es el caso del LPS en macrófagos, a través de la fosforilación de la serina del Stat1 como se describió para clase I.

El estímulo de células B por la interleucina 4 (IL-4, por su abreviación en Inglés) aumenta el número de moléculas de clase II, pero su mecanismo aun no se ha descrito y es necesaria su explicación debido a que es una citocina antagónica al IFN $\gamma$  y viceversa.

La regulación del aumento de la molécula de clase II por IFN $\gamma$ , al igual que clase I es el evento final de todo el procesamiento y presentación del antígeno para dar inicio a la inmunogenicidad, pero el IFN $\gamma$  regula otros eventos intracelulares indispensables en este proceso como son el aumento de la proteasa ácida para la formación de los péptidos a partir de proteínas presentes en los compartimentos vesiculares; regula también la síntesis y ensamble de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  que conforman la molécula de clase II y de la glicoproteína transmembranal llamada cadena invariante (Ii, por sus siglas en Inglés) necesaria para evitar la unión de los péptidos provenientes del retículo endoplásmico al sitio de anclaje de la molécula de clase II; por último participa en la regulación de la molécula tipo clase II llamada DM que es importante para la remoción del péptido de la cadena invariante asociado a la molécula tipo clase II (CLIP, por sus siglas en Inglés) del sitio de unión de la molécula de clase II, permitiendo así la unión del péptido y su presentación posterior al receptor de la célula T CD4 $^+$ .

### **El IFN $\gamma$ en los pollos (*Gallus gallus*).**

La importancia biológica del IFN $\gamma$  en la defensa del huésped contra los microorganismos intracelulares ha sido ampliamente documentada en los mamíferos. En otras especies como los pollos, que también son susceptibles a la infección por microorganismos intracelulares, el entendimiento y la búsqueda de sus mecanismos de defensa no han sido bien estudiados como en los mamíferos, dejando únicamente la comparación teórica.

En el último lustro, algunos grupos de investigadores han buscado en los pollos, moléculas homólogas a la de los mamíferos para iniciar el estudio de la inmunología del pollo o para buscar herramientas terapéuticas. Recientemente, la primer molécula buscada en los pollos por su importancia biológica en los mamíferos fue el IFN $\gamma$  (Digby, M.R. y Lowenthal, J.W. 1995). Dicha molécula se ha demostrado que es producida por los linfocitos T (Lowenthal, J.W., *et al*, 1995) y sus funciones biológicas que se han logrado estudiar muestran una identidad con su homólogo en mamíferos (Lowenthal, J.W., *et al*, 1995; Weining, K.C., *et al*, 1996; Song, K.D., *et al*, 1997). Sin embargo, existen diferencias notables en la secuencia de bases y de aminoácidos (AA), con respecto a los mamíferos y es probable su restricción funcional a la especie *Gallus gallus*. Sin embargo, la participación de esta molécula en el aumento de la defensa del huésped ante las infecciones intracelulares solo ha sido reportada *in vitro* con virus no específicos para la especie *Gallus gallus* (Sekellick, M.J., *et al*, 1998) y con la inhibición de la multiplicación de *Eimeria tenella* en fibroblastos de embrión de pollo e *in vivo* con la disminución en la liberación de oocistos de *E. Acervulina* (Lillehoj, H.S., y Choi, K.D., 1998).

### ***Salmonella sp.***

Uno de los patógenos intracelulares que infectan a un gran número de especies animales como son los reptiles, aves y mamíferos, es la *Salmonella*. La *Salmonella* es una bacteria intracelular facultativa que tiene la habilidad de la supervivencia y multiplicación dentro de las células fagocíticas profesionales del

huésped (Fields, P.I., *et al*, 1986; Miller, S.J., y Mekalanos, J.J., 1990; Finlay, B.B., y Cossart, P., 1997), a través de la liberación de las proteínas del sistema de secreción tipo III al medio intracelular de los fagocitos. Estas proteínas están codificadas en diferentes grupos de genes llamados islas de patogenicidad (I.Pg). Las proteínas responsables de la replicación en los compartimentos intracelulares de los fagocitos profesionales se encuentran en la I.Pg tipo 2 (Shea, J.E., *et al*, 1996; Cirillo, D.M., *et al*, 1998; Hensel, M., *et al*, 1998); las proteínas responsables de la supervivencia en condiciones limitantes de  $Mg^{2+}$  están en la I.Pg tipo 3 (Blanc-Potard, A.B., *et al*, 1999; Blanc-Potard, A.B., y Groisman, E.A., 1997), y la I.Pg tipo 4 codifica para proteínas del sistema de secreción tipo I, que participan en la secreción de toxinas y se cree que en la adaptación de la bacteria al ambiente del compartimento intracelular del macrófago (Wong, K.K., *et al*, 1998). También existe la participación de las proteínas que participan en la lisis de los macrófagos codificadas por los plásmidos de *Salmonella* (Guilloteau, L.A., *et al*, 1996). Los genes que participan en los compartimentos intracelulares del macrófago, están sujetos a un sistema de regulación por los componentes PhoQ/PhoP; al sensor SirA., PmrB/PmrA., SsrA/SsrB y EnvZ/OmpR que le permiten a la bacteria adaptarse al ambiente hostil de los compartimentos de los fagocitos profesionales (Gun, J.S., y Miller, S.I., 1996; Johnston, C., *et al*, 1996; Baker, S.J., *et al*, 1997).

### **Características de la infección por *Salmonella* en los pollos.**

Del género *Salmonella*, las principales especies que son capaces de infectar a los pollos, tenemos a *gallinarum*, *pullorum*, *enteritidis* y *typhimurium*. Todas ellas afectan principalmente a los pollitos recién nacidos hasta sus primeros 7 días de edad, posteriormente los pollitos adquieren una resistencia natural a la enfermedad incluso a dosis de  $10^8$  unidades formadoras de colonia por la vía natural (Smith, H.W., y Tucker, J.F., 1980; Ziprin, R.L., *et al*, 1989; Cooper, G.L., *et al*, 1994). Sin embargo, algunas líneas de pollos pueden enfermar e incluso

hasta morir en su edad joven o adulta con dosis más bajas (Gast, R.K., y Beard, C.W., 1990; Zhang-Barber, L., *et al*, 1998).

Hasta ahora sabemos que *Salmonella* infecta y sobrevive de la misma manera en el sistema reticuloendotelial tanto del mamífero como del pollo (Barrow. P.A., *et al*, 1994) y es fagocitada por células fagocíticas profesionales de bazo (en su mayoría macrófagos), polimorfonucleares y monocitos de sangre periférica (Kodama, H., *et al*, 1976; Stabler, J.G., *et al*, 1994). Sin embargo, no sabemos cuales son los mecanismos clave para el control y erradicación de la bacteria por parte del sistema inmunológico del pollo tanto en las líneas susceptibles como resistentes.

## JUSTIFICACIÓN

Como sabemos, el IFN $\gamma$  ha mostrado tanto *in vivo* como *in vitro* una participación clave en el control de microorganismos intracelulares como *Salmonella sp* en el ratón. Su participación, obedece en gran parte a la activación de las células fagocíticas profesionales como el macrófago, donde a través de los mecanismos anteriormente descritos, el fagocito logra disminuir y frenar la multiplicación de la bacteria hasta disminuirla casi por completo. Considerando que en los pollos leghorn, la *Salmonella* no enferma al animal, pero sí persiste en el sistema reticuloendotelial, y que se ha mostrado *in vitro* la capacidad del IFN $\gamma$  para inducir la producción de ON y la regulación del aumento de las moléculas de clase I y II en los macrófagos y la inhibición de la multiplicación de *Eimeria tenella* en fibroblastos de embrión de pollo. Entonces el macrófago y el IFN $\gamma$  del pollo tendrán una participación notable en la disminución de la bacteria intracelular, lo que evidenciaría indirectamente, la presencia de los mecanismos dependientes e independientes de O<sub>2</sub> y N regulados por IFN $\gamma$  en los pollos, y directamente mostraría la primera evidencia acerca de la importancia de esta linfocina en el control de microorganismos intracelulares en los macrófagos, así como la conservación de esta vía de defensa entre pollos y mamíferos. Todo esto, nos

hasta morir en su edad joven o adulta con dosis más bajas (Gast, R.K., y Beard, C.W., 1990; Zhang-Barber, L., *et al*, 1998).

Hasta ahora sabemos que *Salmonella* infecta y sobrevive de la misma manera en el sistema reticuloendotelial tanto del mamífero como del pollo (Barrow. P.A., *et al*, 1994) y es fagocitada por células fagocíticas profesionales de bazo (en su mayoría macrófagos), polimorfonucleares y monocitos de sangre periférica (Kodama, H., *et al*, 1976; Stabler, J.G., *et al*, 1994). Sin embargo, no sabemos cuales son los mecanismos clave para el control y erradicación de la bacteria por parte del sistema inmunológico del pollo tanto en las líneas susceptibles como resistentes.

## JUSTIFICACIÓN

Como sabemos, el IFN $\gamma$  ha mostrado tanto *in vivo* como *in vitro* una participación clave en el control de microorganismos intracelulares como *Salmonella sp* en el ratón. Su participación, obedece en gran parte a la activación de las células fagocíticas profesionales como el macrófago, donde a través de los mecanismos anteriormente descritos, el fagocito logra disminuir y frenar la multiplicación de la bacteria hasta disminuirla casi por completo. Considerando que en los pollos leghorn, la *Salmonella* no enferma al animal, pero sí persiste en el sistema reticuloendotelial, y que se ha mostrado *in vitro* la capacidad del IFN $\gamma$  para inducir la producción de ON y la regulación del aumento de las moléculas de clase I y II en los macrófagos y la inhibición de la multiplicación de *Eimeria tenella* en fibroblastos de embrión de pollo. Entonces el macrófago y el IFN $\gamma$  del pollo tendrán una participación notable en la disminución de la bacteria intracelular, lo que evidenciaría indirectamente, la presencia de los mecanismos dependientes e independientes de O<sub>2</sub> y N regulados por IFN $\gamma$  en los pollos, y directamente mostraría la primera evidencia acerca de la importancia de esta linfocina en el control de microorganismos intracelulares en los macrófagos, así como la conservación de esta vía de defensa entre pollos y mamíferos. Todo esto, nos

ayudaría a entender *in vitro*, el mecanismo de resistencia natural hacia *Salmonella* en los pollos.

## HIPÓTESIS

El IFN $\gamma$  y el macrófago son dos elementos relevantes en la defensa del pollo hacia las infecciones intracelulares por *Salmonella*, por lo que su participación en la defensa ante este tipo de infecciones será una característica compartida y conservada a través de la evolución

## OBJETIVOS

### GENERAL.

Clonar y expresar en forma recombinante el IFN $\gamma$  de pollo y estudiar su participación en la activación de los mecanismos microbicidas del macrófago de pollo infectado con *Salmonella gallinarum*.

### PARTICULARES.

- I. Clonar y expresar en forma recombinante la molécula de IFN $\gamma$  de pollo en un sistema eucariote de mamífero.
- II. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para inducir la producción de ON en los macrófagos HD11.
- III. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para regular la elevación de la molécula de clase II en los macrófagos HD11.
- IV. Evaluación de la capacidad fagocítica de los macrófagos HD11 hacia la cepa silvestre patógena de *S. gallinarum* U2.
- V. Evaluación de la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre patógena de *Salmonella gallinarum* U2 dentro de los macrófagos HD11.

ayudaría a entender *in vitro*, el mecanismo de resistencia natural hacia *Salmonella* en los pollos.

## HIPÓTESIS

El IFN $\gamma$  y el macrófago son dos elementos relevantes en la defensa del pollo hacia las infecciones intracelulares por *Salmonella*, por lo que su participación en la defensa ante este tipo de infecciones será una característica compartida y conservada a través de la evolución

## OBJETIVOS

### GENERAL.

Clonar y expresar en forma recombinante el IFN $\gamma$  de pollo y estudiar su participación en la activación de los mecanismos microbicidas del macrófago de pollo infectado con *Salmonella gallinarum*.

### PARTICULARES.

- I. Clonar y expresar en forma recombinante la molécula de IFN $\gamma$  de pollo en un sistema eucariote de mamífero.
- II. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para inducir la producción de ON en los macrófagos HD11.
- III. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para regular la elevación de la molécula de clase II en los macrófagos HD11.
- IV. Evaluación de la capacidad fagocítica de los macrófagos HD11 hacia la cepa silvestre patógena de *S. gallinarum* U2.
- V. Evaluación de la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre patógena de *Salmonella gallinarum* U2 dentro de los macrófagos HD11.

ayudaría a entender *in vitro*, el mecanismo de resistencia natural hacia *Salmonella* en los pollos.

## HIPÓTESIS

El IFN $\gamma$  y el macrófago son dos elementos relevantes en la defensa del pollo hacia las infecciones intracelulares por *Salmonella*, por lo que su participación en la defensa ante este tipo de infecciones será una característica compartida y conservada a través de la evolución

## OBJETIVOS

### GENERAL.

Clonar y expresar en forma recombinante el IFN $\gamma$  de pollo y estudiar su participación en la activación de los mecanismos microbicidas del macrófago de pollo infectado con *Salmonella gallinarum*.

### PARTICULARES.

- I. Clonar y expresar en forma recombinante la molécula de IFN $\gamma$  de pollo en un sistema eucariote de mamífero.
- II. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para inducir la producción de ON en los macrófagos HD11.
- III. Determinación de la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para regular la elevación de la molécula de clase II en los macrófagos HD11.
- IV. Evaluación de la capacidad fagocítica de los macrófagos HD11 hacia la cepa silvestre patógena de *S. gallinarum* U2.
- V. Evaluación de la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre patógena de *Salmonella gallinarum* U2 dentro de los macrófagos HD11.



VI. Evaluación de la capacidad del IFN $\gamma$  para incrementar la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 infectados con la cepa silvestre patógena de *Salmonella gallinarum* U2.

## METODOLOGÍA

**Animales.** Se usaron pollos machos maduros de 4 a 6 meses de edad de la estirpe leghorn blanca clínicamente sanos y libres de *Salmonella sp*; alojados en unidades de aislamiento y mantenidos con alimento y agua *ad libitum*.

**Macrófagos.** Se utilizó una línea de macrófagos provenientes de médula ósea de pollo tipo leghorn llamada HD11. Los macrófagos fueron crecidos y mantenidos en medio DMEM suplementado con 8% de suero de pollo descomplementado (GIBCO) y 2% de suero fetal bovino descomplementado (SFB)(EQUITEC) a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio recibirá el nombre de DMEM-8-2.

**Producción de IFN $\gamma$  nativo a partir de células de bazo.** El bazo fue extraído en forma aséptica y mantenido en medio de cultivo DMEM a 41°C (GIBCO). Se procedió al descapsulado y al fraccionamiento del órgano en pequeños pedazos. Los pedazos de tejido fueron macerados suavemente en una bolsa de tela organza con 10ml de medio DMEM a 41°C para disgregar las células. Del homogenizado se transfirieron 3ml y se centrifugaron a 250 x g por 5 minutos. El lisado de células rojas se realizó resuspendiendo el botón de células totales de bazo en 15ml de solución amortiguadora de lisis ( 0.15M de NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM de KHCO<sub>3</sub> y 0.1 mM de EDTA, a pH de 7.2-7.4) a 41°C por 5-7 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con medio DMEM a 41°C. El botón de células blancas fue resuspendido en medio DMEM y separado por Percoll al 70% (SIGMA) para obtener las células mononucleares. Las células mononucleares fueron lavadas 2 veces con medio DMEM y resuspendidas en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino (llamado DMEM-5), 5 x 10<sup>-5</sup> M de 2-beta-mercaptoetanol

VI. Evaluación de la capacidad del IFN $\gamma$  para incrementar la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 infectados con la cepa silvestre patógena de *Salmonella gallinarum* U2.

## METODOLOGÍA

**Animales.** Se usaron pollos machos maduros de 4 a 6 meses de edad de la estirpe leghorn blanca clínicamente sanos y libres de *Salmonella sp*; alojados en unidades de aislamiento y mantenidos con alimento y agua *ad libitum*.

**Macrófagos.** Se utilizó una línea de macrófagos provenientes de médula ósea de pollo tipo leghorn llamada HD11. Los macrófagos fueron crecidos y mantenidos en medio DMEM suplementado con 8% de suero de pollo descomplementado (GIBCO) y 2% de suero fetal bovino descomplementado (SFB)(EQUITEC) a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio recibirá el nombre de DMEM-8-2.

**Producción de IFN $\gamma$  nativo a partir de células de bazo.** El bazo fue extraído en forma aséptica y mantenido en medio de cultivo DMEM a 41°C (GIBCO). Se procedió al descapsulado y al fraccionamiento del órgano en pequeños pedazos. Los pedazos de tejido fueron macerados suavemente en una bolsa de tela organza con 10ml de medio DMEM a 41°C para disgregar las células. Del homogenizado se transfirieron 3ml y se centrifugaron a 250 x g por 5 minutos. El lisado de células rojas se realizó resuspendiendo el botón de células totales de bazo en 15ml de solución amortiguadora de lisis ( 0.15M de NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM de KHCO<sub>3</sub> y 0.1 mM de EDTA, a pH de 7.2-7.4) a 41°C por 5-7 minutos. Posteriormente se realizaron 2 lavados con medio DMEM a 41°C. El botón de células blancas fue resuspendido en medio DMEM y separado por Percoll al 70% (SIGMA) para obtener las células mononucleares. Las células mononucleares fueron lavadas 2 veces con medio DMEM y resuspendidas en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino (llamado DMEM-5), 5 x 10<sup>-5</sup> M de 2-beta-mercaptoetanol

y 10µg/ml de concanavalina-A (SIGMA). Las células fueron ajustadas a una concentración de  $8 \times 10^6$  células por ml e incubadas por 48 horas a 41°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para inactivar a la concanavalina-A residual se adicionó 40µg/ml de alfa-metil-piranosido (SIGMA). El sobrenadante fue obtenido por centrifugación y alicuotado a razón de 1ml por vial y congelado a -80°C hasta su uso.

#### **Expresión del ARNm del IFN $\gamma$ a partir de células de bazo.**

Las células de bazo fueron obtenidas y cultivadas como se describió anteriormente. El tiempo de incubación de las células con la concanavalina-A fue de 6 – 8 horas. Seguidamente a las células se les retiró el medio de cultivo por centrifugación y el botón de células se dejó para la extracción del ARN.

**Extracción de ARN total.** El ARN fue extraído utilizando el método del TRIzol según especificaciones de los proveedores (GIBCO). Se extrajo ARN a partir de  $8 \times 10^6$  células por ml de TRIzol. El ARN fue cuantificado y almacenado en tubos eppendorf a -80°C hasta su uso.

**Obtención del ARNm y síntesis de ADNc.** Se uso 1µg de ARN total para la síntesis de ADNc, utilizando un iniciador de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (GIBCO) y la enzima de transcripción reversa (TR) Super script II (GIBCO).

**Amplificación del gene por reacción en cadena de la polimerasa (RCP).** Para la amplificación completa del gene se diseñaron los siguientes iniciadores: El sentido 5'-GAATTCATGACTTGCCAGACTTACAAC-3' al que se le agregó un sitio EcoRI y el antisentido 3'-GTCTCCTCTACGTTAACGATTCAGCTG-5' al que se le agregó un sitio Sal I. Para la síntesis del gene se usaron 63µM de cada iniciador, 10mM de DNTP's, < 300nM de ADNc y 2.5 U de polimerasa Pwo (Lakeside). La RCP se realizó a 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1.3 minutos durante 32 ciclos. El fragmento amplificado corresponde a una banda de 510pb que se observó en un gel de agarosa al 1.5%.

**Amplificación interna del gene.** Para corroborar que el gene amplificado corresponde al de IFN $\gamma$ , se realizó otra RCP tomando como plantilla el ADNc de 510pb obtenido anteriormente por TR-RCP. Se diseñaron y usaron los siguientes iniciadores para obtener un fragmento esperado de 183pb. El sentido es 5'-GCTGACGGTGGACCTATTATT-3' y el antisentido es 5'-ATCAGGAAGGTTGTTTTTCAG-3'. Para la síntesis del fragmento se usaron 49.9 $\mu$ M de cada iniciador, 10mM de DNTP's, 300ng de ADNc y 2.5 U de polimerasa *Taq* (Lakeside). La RCP se realizó a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos durante 24 ciclos.

**Clonación del gene.** El gene del IFN $\gamma$  fue clonado en sitios romos en un vector de expresión eucariote llamado pCI-neo (PROMEGA), quedando bajo el promotor del citomegalovirus y expresado bajo la secuencia del SV40 con resistencia a la ampicilina y geneticina. Las clonas positivas fueron rastreadas por resistencia a la ampicilina. A partir de las clonas positivas se realizó la búsqueda de aquellas clonas con el marco de lectura apropiado a través de su restricción a *Sac* I, Las clonas con marco de lectura correcto se usaron para transfectar células COS-7 y buscar la clona que exprese la proteína recombinante con actividad biológica.

**Expresión del gene de IFN $\gamma$  recombinante.** 1 x 10<sup>5</sup> células COS-7, fueron transfectadas con una mezcla de 1 $\mu$ g de ADN de la construcción del pCI-neo + el gene de IFN $\gamma$  en 3 $\mu$ l de solución de lípidos sin formación de liposomas (FuGENE-6-Boehringer Mannheim) siguiendo las indicaciones del fabricante. El sobrenadante se recolectó a las 48 horas posteriores a la transfección e inmediatamente se realizó la búsqueda de la actividad biológica a través de ensayos de detección del ON en la línea de macrófagos de médula ósea de pollo HD11.

**Cuantificación de la producción de ON inducido por IFN $\gamma$  de pollo.** A  $10^5$  macrófagos de pollo HD11 en 100 $\mu$ l de medio RPMI con 5% de SFB sin rojo de fenol por pozo (placa de 96) se les adicionaron 100 $\mu$ l de las diluciones decuples de los sobrenadantes resultantes de la transfección transitoria del vector recombinante, del vector vacío, del sobrenadante de las células COS-7, del reactivo de la transfección y del sobrenadante del IFN nativo, los cuales fueron incubados por 24 horas a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La detección de ON, se realizó indirectamente, midiendo el NO<sub>2</sub> formado a partir del ON producido, evaluando el sobrenadante de cultivo con la técnica de Griess (Green, L.A., *et al*, 1982). Se tomaron 100 $\mu$ l de cada pozo, a los cuales se les adicionó el reactivo de Griess, 50 $\mu$ l de la solución A (1% de Sulfanilamida) + 50 $\mu$ l de la solución B [0.1% de Naftilentilamida-diamina y 2.5% de ácido ortofosfórico (SIGMA)], se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó en un lector de luz visible a 540nm.

**Transfección estable del gene de IFN $\gamma$  de pollo.** Una vez obtenidas las clonas con actividad inductora de ON, se realizó una segunda transfección, pero en células L, las células fueron seleccionadas por su resistencia a la geneticina (GIBCO) a una dosis de 20 $\mu$ g/ml durante 25 días, al término de este período se retiro la geneticina y se dejaron las células por 72 horas con medio DMEM complementado con 10% de SFB bajo las mismas condiciones de cultivo. Posteriormente el sobrenadante fue probado por su capacidad para inducir ON en macrófagos HD11. La clona con la mayor capacidad para inducir ON fue expandida y su sobrenadante alicuotado a razón de 1ml y congelado a -80°C hasta su uso.

**Secuencia de la clona con mayor índice de producción de ON.** Fue secuenciado  $\frac{3}{4}$  partes del gene clonado en el vector pCI-neo para corroborar su fidelidad con la secuencia original, a través de un secuenciador automático

(PERKIN ELMER modelo 310), usando el iniciador con sentido 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' del promotor T7.

**Cuantificación de moléculas del MHC clase II:**  $10^6$  macrófagos de pollo HD11 en 2ml de medio DMEM-5 fueron incubados a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas con 25% de los siguientes sobrenadantes: Clona 13B1.9 (vector recombinante), vector vacío, IFN nativo y 5µg/ml de LPS de *S. enteritidis* (SIGMA). Posteriormente las células fueron cosechadas en tubos para citometría de flujo e incubados a 4°C con suero de pollo para bloquear los receptores Fc, después se incubaron a 4°C con el anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la molécula de clase II de pollo (TAP-1) y el anticuerpo irrelevante de ratón IgG2. Los cuales fueron marcados posteriormente con un segundo anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de ratón con isotiocinato de fluoresceína (GIBCO). La intensidad de la fluorescencia fue medida a través del software Lysis II del FACsort (Becton Dickinson).

**Estimulación del macrófago de pollo con IFN $\gamma$  para el ensayo bactericida.** En placa de 12 pozos se cultivaron  $4.5 \times 10^5$  macrófagos HD11 de pollo por pozo en 2ml de medio DMEM-8-2 con 10mM de HEPES (SIGMA) a 41°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas con 30% de los siguientes sobrenadantes: Clona 13B1.9 (vector recombinante), vector vacío e IFN nativo. Transcurridas 23 horas, a los macrófagos se les dejó con 1ml del mismo medio suplementado y se regresaron a la incubadora para su infección a la siguiente hora.

**Preparación de la bacteria.** Se uso la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* (cepa U2) altamente virulenta para pollitos neonatos. Una colonia de la bacteria fue crecida en 20ml de medio de crecimiento soya triptona (TSB-DIFCO) por 18 horas, a 37°C y en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo, se transfirió 1ml del cultivo a un matraz con 10ml de medio TSB fresco y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones por 3 a 4 horas para alcanzar su fase logarítmica. La bacteria fue posteriormente lavada por centrifugación con solución amortiguada de

fosfatos (SAF) a 41°C dos veces. La bacteria fue resuspendida en SAF a 41°C y ajustada a 600nm en un espectrofotómetro a una concentración de  $10^9$  unidades formadoras de colonia (UFC) por ml y mantenida a 41°C antes de su uso.

**Capacidad fagocítica de los macrófagos HD11.** En placa de 12 pozos se cultivaron  $4.5 \times 10^5$  macrófagos de pollo HD11 por pozo en 2ml de medio DMEM-8-2 con 10mM de HEPES (SIGMA) a 41°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Aproximadamente  $10^6$  células fueron infectadas con diferentes concentraciones de bacteria para conocer la máxima capacidad fagocítica de los macrófagos. Para sincronizar la infección la placa fue centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos entre 39 a 41°C y posteriormente incubada a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos para permitir la fagocitosis. Para quitar el exceso de bacteria extracelular, cada pozo fue lavado 2 veces con medio DMEM con 20µg/ml de gentamicina (Shering Ploug), al final de los lavados se agregaron 2ml de medio DMEM-8-2 con 20µg/ml de gentamicina (Buchmeier, N.H., y Heffron, F., 1989) y se mantuvieron en cultivo a 41°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora para eliminar el resto de bacteria extracelular. Después se procedió a lavar 3 veces cada pozo con únicamente medio DMEM para quitar el antibiótico. Para determinar la cantidad de bacteria presente dentro de los macrófagos se realizaron lisis de las células. El lisado celular se llevo a cabo despegando las células con tripsina-EDTA (GIBCO) y transfiriéndolas a un tubo ependorff para concentrarlas por centrifugación (2000rpm por 5 minutos). El botón celular fue lisado con 1ml SAF con 20% de TRITON X-100 (SIGMA) por 1 minuto en un mezclador. El ml del lisado fue vertido en 15ml de agar McConkey (SIGMA) líquido entre 42-45°C, a partir de ahí se realizaron diluciones en log<sub>10.6</sub>, se vaciaron en cajas de petri y se incubaron por 24 horas a 37°C para realizar cuenta viable.

**Supervivencia y multiplicación de *Salmonella gallinarum* U2 dentro de los macrófagos HD11.** Después de conocer la relación de infección óptima de la bacteria con el macrófago, se procedió a realizar la infección como se describió

anteriormente y la recuperación de la bacteria se realizó a diferentes tiempos después de la fagocitosis utilizando el método descrito anteriormente para su cuantificación.

**Capacidad bactericida de los macrófagos HD11 activados por IFN $\gamma$ .** Después de activar a los macrófagos, las células fueron infectadas y la bacteria recuperada como ya se ha descrito. La actividad bactericida fue evaluada en las primeras horas posteriores a la fagocitosis.



## RESULTADOS

**Clonación del ADNc del IFN $\gamma$  de pollo que induce la producción de ON.** El ADNc de 499pb del gene de IFN $\gamma$  de pollo fue amplificado por TR-RCP a partir de células mononucleares de bazo de pollo estimuladas con concanavalina A, utilizando los iniciadores diseñados a partir de la secuencia de ADNc de IFN $\gamma$  de pollo reportada (Digby, M.R., y Lowenthal, J W., 1995). En la figura 2, se observa el fragmento de 510pb que corresponde al peso esperado (11pb más por los 2 sitios de restricción de los iniciadores).

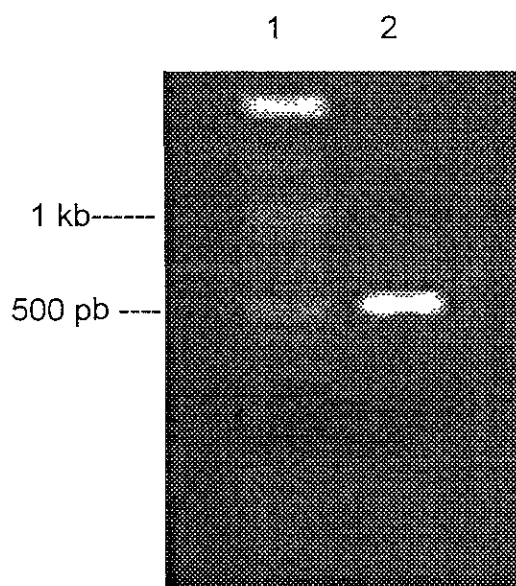


Figura 2. Amplificación del ADNc del gene de IFN $\gamma$  de pollo por TR-RCP a partir de ARN total de células mononucleares de bazo estimuladas por 6-8 horas con concanavalina A. Carril 1: Diferentes tamaños de ADN como referencia; Carril 2: ADNc del gene de IFN $\gamma$  (510pb). El ADN fue corrido en un gel de agarosa al 1.5%.

Posteriormente el fragmento fue clonado en el vector de expresión pCI-neo y para corroborar que el fragmento de 499pb corresponde al IFN $\gamma$  de pollo, se realizó una

RCP interna con iniciadores que amplificaron un fragmento de 183pb a partir de las 4 clonas obtenidas previamente. Como se observa en la figura 3. las 4 clonas amplificaron el fragmento de 183pb, indicando que todos los fragmentos de 499pb son de IFN $\gamma$ .

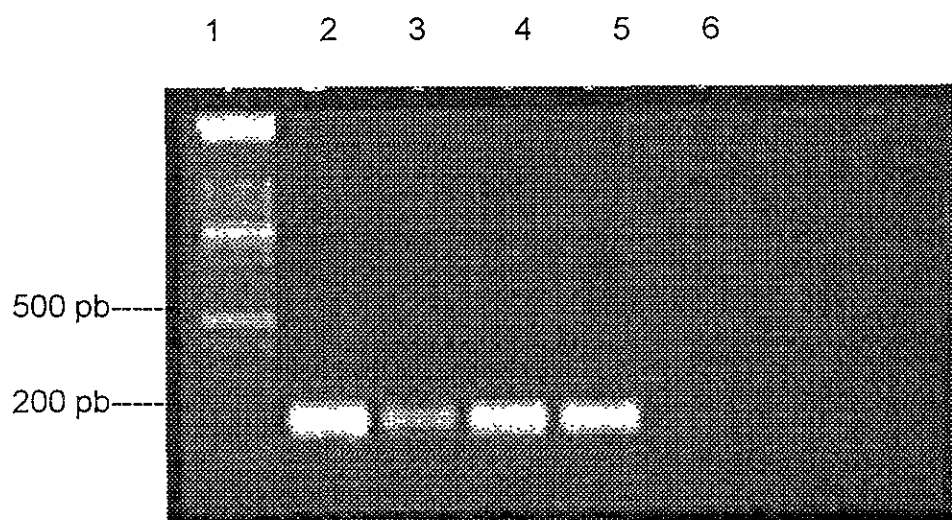


Figura 3. Amplificación interna de un fragmento de 180pb por RCP a partir del ADNc del gene de IFN $\gamma$  obtenido previamente por TR-RCP y clonado en el vector pCI-neo. Carril 1: Diferentes tamaños de ADN como referencia; Carriles 2,3,4 y 5: Clonas 15 A, 10B, 13B y 21B respectivamente; Carril 6: vector pCI-neo. El fragmento amplificado fue corrido en un gel de agarosa al 1.8%.

Seguidamente fue buscada la posición del gene dentro del vector de expresión para saber si podía ser transcrito correctamente. Para ello, las construcciones fueron sometidas a la restricción con Sac I, un sitio que está en la posición 729 del vector pCI-neo y otro en la posición 299 del gene de IFN $\gamma$ . Los resultados de la restricción se observaron en un gel de agarosa al 1%, donde se esperaron 2 posibles fragmentos de ADN: Uno de 603 y 5381pb que indicaba que el gene no

sería transcrito por el promotor de citomegalovirus y otro de 703 y 5281pb que indicaba su orientación correcta para la transcripción. En la figura 4, se observó que solo 2 de las 4 clonas estaban en posición correcta y que podrían usarse para transfectar (solo se muestran los fragmentos de 603 y 703pb donde se puede distinguir fácilmente la longitud del ADNc).

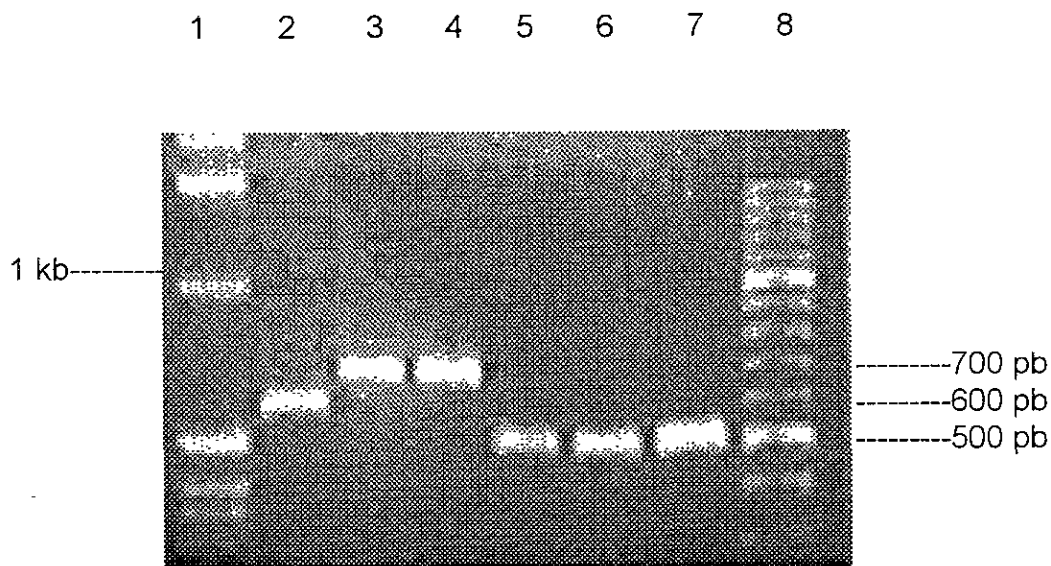
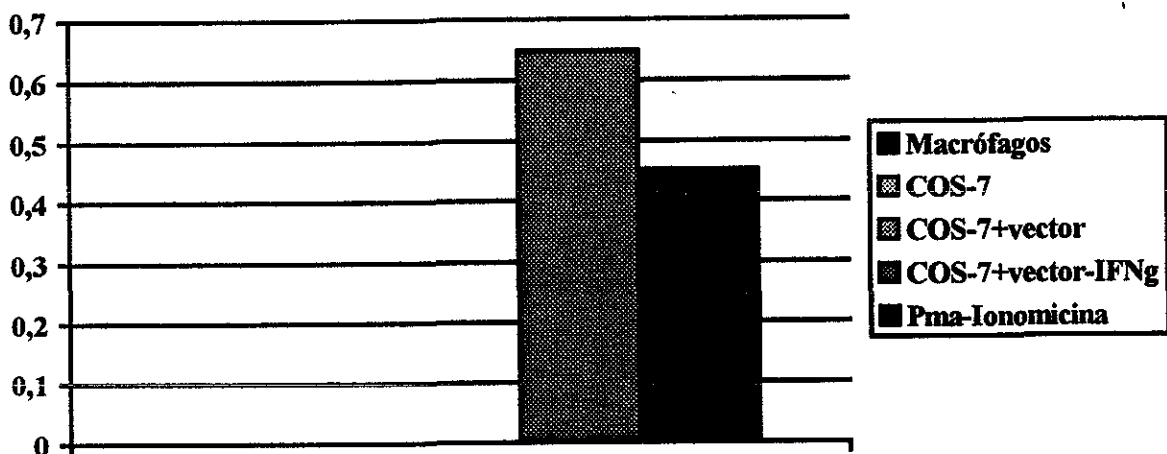


Figura 4. El ADNc del gene de IFN $\gamma$  (499pb) de pollo fue clonado en el sitio SmaI del vector pCI-neo (5474pb). El total de la construcción fue de 5984pb. La orientación correcta de lectura del gene de IFN $\gamma$ , se estudió a través de la restricción a SacI. Carril 1: Diferentes tamaños de ADN como referencia; Carril 2: Clona 10B (fragmento de 603pb en posición inversa); Carril 3: Clona 13B (fragmento de 703pb en posición correcta); Carril 4: Clona 21B (fragmento de 703pb en posición correcta); Carril 5, 6 y 7: ADNc del gene de IFN $\gamma$  (499pb) liberado del vector bajo restricción de EcoRI y HindIII de las clonas 10B, 13B y 21B respectivamente; Carril 8. Diferentes tamaños de ADN como referencia. Los fragmentos de ADNc fueron corridos en un gel de agarosa al 1%.

Había que probar ahora, que efectivamente los 2 clonas candidatas serían capaces de expresar una proteína recombinante funcional, para esto, las 2 clonas

se usaron para transfectar células COS-7. Para tener una mayor cantidad de proteína recombinante producida por las células COS-7, el sobrenadante del medio de cultivo se recolectó a las 72h posteriores a la transfección y se probaron frescos en un ensayo de producción de ON, estimulando a los macrófagos HD11 de pollo por 24h. La detección del ON se realizó midiendo indirectamente la presencia de NO<sub>2</sub> producido por los macrófagos en el sobrenadante del medio de cultivo, que reacciona con los reactivos de Griess, el producto de la reacción da una coloración que se cuantificó en un espectrofotómetro a 540nm. En la figura 5 se muestra la actividad del ADNc del IFN $\gamma$  recombinante que indujo la producción de ON en un 33% más que en los macrófagos estimulados con PMA-Ionomicina.

D.O. A 540nm de 100 $\mu$ L / 10<sup>5</sup> Células



Macrófagos estimulados con el 50% de diferentes sobrenadantes

Figura 5. Producción de óxido nítrico por macrófagos HD11 activados durante 24h con 50% del sobrenadante fresco de células COS-7 transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  de pollo. La producción de ON se evaluó en forma indirecta midiendo la concentración de NO<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo a través de la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess y cuantificados a 540nm

El otro ADNc del IFN $\gamma$  recombinante (clona 12B) que también se uso para transfectar las células COS-7 indujo la producción de ON pero en aproximadamente un 60% menos que la clona 13B y un 66% menos que el PMA-lonomicina, que posiblemente se deba a un bajo porcentaje de transfección (datos no mostrados).

**Secuencia del gene expresado en forma recombinante.** Sabíamos que el gene expresado en forma recombinante correspondía al IFN $\gamma$  de pollo por su amplificación por TR-RCP, RCP interna y su actividad biológica. Sin embargo, para corroborar la fidelidad de la secuencia con la reportada, se secuenció una  $\frac{3}{4}$  del ADNc de gene completo de IFN $\gamma$  recombinante que tuvo la mayor actividad, a través de la RCP con dideoxinucleótidos marcados. La lectura de la marca se realizó en un ABIPRISM 310 versión 3.0. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos tuvo una similitud del 98% y 98.18% respectivamente, con respecto a la secuencia de IFN $\gamma$  de pollo reportada (Digby, M.R., y Lowenthal, J.W., 1995). El 2% que no correspondía con la secuencia original, consistió en la ausencia de una prolina en la posición 34 de la proteína madura, que podría ser sustituida por otros aminoácidos como F, S, T y C, en vista de que el codon presentó una base no determinada (TnT); el otro cambio de AA se observó en la posición 44 de la proteína madura que consistió en la sustitución de una serina por una treonina y el intercambio de una timina-citocina por una citocina-timina en la posición 41 y 42 de la secuencia de nucleótidos que codifican para el péptido señal (Figura 6 y 7).

Fin de la secuencia señal



```
IFN $\gamma$  1 ATGACTTGCCAGACTTACAACCTGTTTGTTCGTCTGTCATCATGATTTATTATGGACAT
13B 1 ATGACTTGCCAGACTTACAACCTGTTTGTTCGTTCGTCTGTCATCATGATTTATTATGGACAT
61 ACTGCAAGTAGTCTAAATCTTGTTCAACTTCAAGATGATATAGACAAACTGAAAGCTGAC
61 ACTGCAAGTAGTCTAAATCTTGTTCAACTTCAAGATGATATAGACAAACTGAAAGCTGAC
121 TTTAACTCAAGTCATTCAGATGTAGCTGACGGTGGACCTATTATTGTAGAGAAACTGAAG
121 TTTAACTCAAGTCATTCAGATGTAGCTGACGGTGGATNTATTATTGTAGAGAAACTGAAG
181 AACTGGACAGAGAGAAATGAGAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTTCGATGTACTTG
181 AACTGGTCAGAGAGAAATGAGAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTTCGATGTACTTG
241 GAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCCGCACATCAAACACATATCTGAGGAGCTC
241 GAAATGCTTGAAAACACTGACAAGTCAAAGCCGCACATCAAACACATATCTGAGGAGCTC
301 TATACTCTGAAAAACAACCTTCCTGATGGC
301 TATACTCTGAAAAACAACCTTCCTGATGGC
```

Figura 6. Similitud de la secuencia de nucleótidos del gene de IFN $\gamma$  del pollo (330 bases de la clona 13B) con respecto a la del gene de IFN $\gamma$  de pollo reportada. Un asterisco entre las 2 secuencias representa la no similitud por cada base y la letra N en la secuencia de la clona 13B indica la presencia de una base no determinada.

IFN $\gamma$ :MTCQTYNLFVLSVIMIYYGHTASSLNLVQLQDDIDKLKADFNSSHSDVADGG  
13B: MTCQTYNLFVLSVIMIYYGHTASSLNLVQLQDDIDKLKADFNSSHSDVADGG

IFN $\gamma$ :PIIVEKLKNWTERNEKRIILSQIVSMYLEMLENTDKSKPHIKHISEELYTLKNN  
13B: --IIVEKLKNW**S**ERNEKRIILSQIVSMYLEMLENTDKSKPHIKHISEELYTLKNN

IFN $\gamma$ : LPDG

13B: LPDG

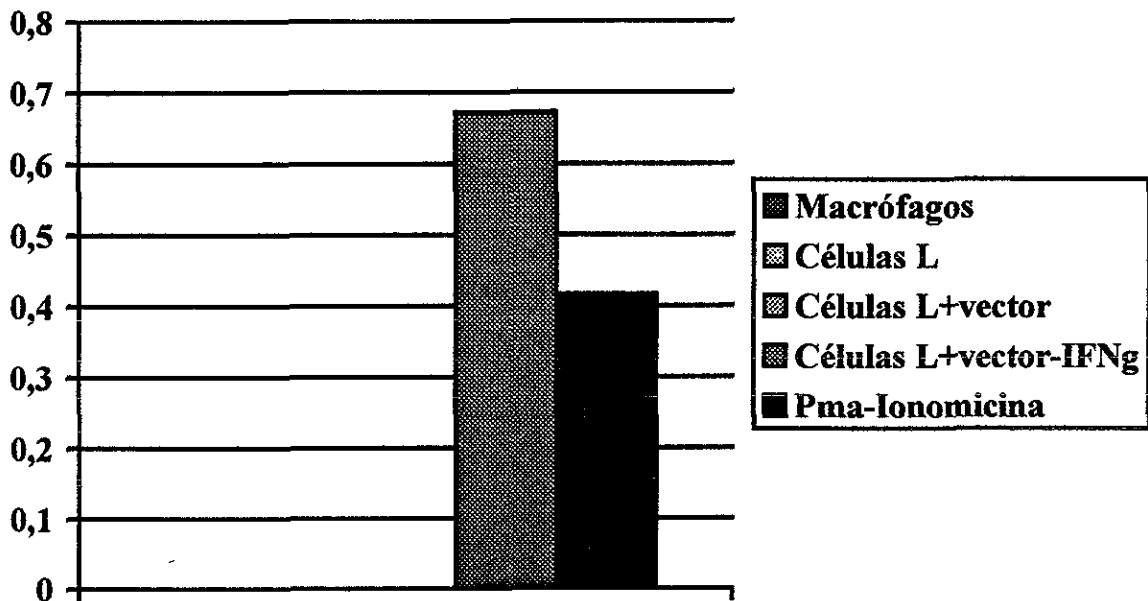
Figura 7. Similitud de la secuencia de una  $\frac{1}{4}$  de la proteína de IFN $\gamma$  del pollo (110 aminoácidos de la clona 13B) con respecto a la de IFN $\gamma$  de pollo reportada. La letra resaltada en negro representa el cambio de un aminoácido y el guión (--) indica la presencia de cualquiera de los siguientes aminoácido: F, T, S y C.

#### **Búsqueda de la clona estable inductora de ON por selección a la genética.**

Para obtener una producción constante y suficiente de la proteína recombinante con actividad de ON para los siguientes experimentos. Células L fueron transfectadas con la construcción del ADN de la clona 13B (ADN circular), seleccionadas y mantenidas por 25 días con 20 $\mu$ g/ml de geneticina. Posteriormente para determinar si las clonas resistentes a la geneticina producían la proteína funcional recombinante, a las clonas se les retiró la geneticina, se les adicionó medio fresco y se dejaron incubar por 72 horas más. El IFN $\gamma$  recombinante fue probado nuevamente por su capacidad para inducir la producción de ON en macrófagos HD11 estimulados por 24 horas tal y como ya se ha descrito. Como se observó en la figura 8, el IFN $\gamma$  recombinante obtenido de la selección de las células L transfectadas con el vector recombinante funcional (clona 13B), aumentó la producción de ON en los macrófagos estimulados en aproximadamente 61% más que los macrófagos estimulados con PMA-nomicina.

Lo que nos indica que el ADNc del IFN $\gamma$  recombinante (Clona 13B) se ha expresado y mantenido en las células L.

D.O. A 540nm de 100 $\mu$ L/ 10<sup>5</sup> Células



Macrófagos estimulados con el 50 % de diferentes sobrenadantes

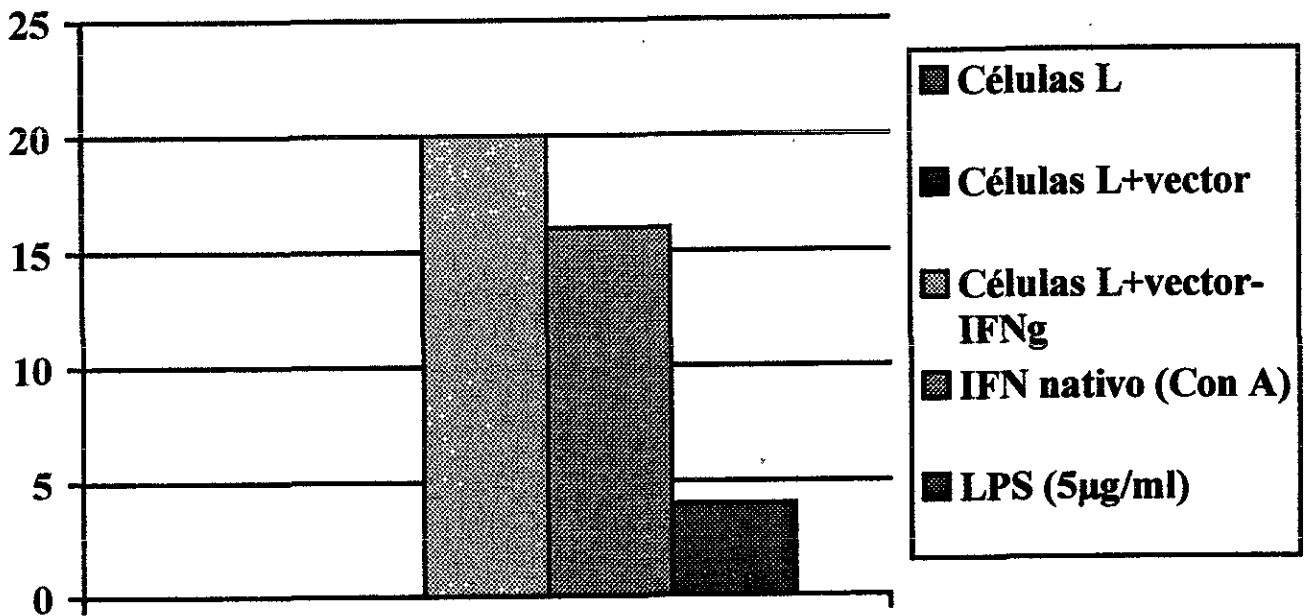
Figura 8. Producción de óxido nítrico por macrófagos HD11 activados durante 24h con 50% del sobrenadante fresco de células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. La producción de ON se evaluó en forma indirecta midiendo la concentración de NO<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo a través de la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess y cuantificados a 540nm

**Incremento de la molécula de clase II por el IFN $\gamma$  recombinante.** La producción de ON no es la única actividad biológica por IFN $\gamma$ . Otra de las actividades reguladas por IFN $\gamma$  y que tiene mayor relevancia en el sistema inmune es la regulación del aumento de las moléculas de clase II. Para corroborar lo anterior, al IFN $\gamma$  recombinante producido por las células L (clona 13B1.9), se le determinó su



capacidad para regular el aumento de las moléculas de clase II en los macrófagos HD11. Macrófagos HD11 fueron estimulados por 48 horas con 20% del sobrenadante del IFN $\gamma$  recombinante de la clona 13B1.9. El incremento de moléculas de clase II fue determinado por citometría de flujo usando como primer anticuerpo, IgG2 de ratón anti-clase II de pollo e IgG de cabra anti-IgG de ratón como segundo anticuerpo. En la figura 9, se observa que el IFN $\gamma$  recombinante, aumento en 20% el número de moléculas de clase II en la superficie de los macrófagos y un 20% más con respecto al IFN nativo (esplenocitos estimulados con concanavalina A). Debido a que el aumento de clase II no fue notablemente superior al IFN nativo, era probable que los macrófagos HD11 bajo las condiciones de cultivo con 80% de Suero de pollo, 20% de SFB y libre de antibióticos tuviera LPS. El LPS también se conoce que incrementa clase II, por tal razón los macrófagos fueron estimulados también con LPS de *S. enteritidis* (SIGMA). En la misma gráfica podemos observar que el LPS incremento en 4% las moléculas de clase II. Sin embargo, el IFN $\gamma$  recombinante aumento un 16% más que el LPS, lo anterior indica que la baja expresión de las moléculas de clase II en los macrófagos HD11 estimulados no se debe al LPS, sino al comportamiento de estos macrófagos bajo estas condiciones de cultivo. Como referencia de la actividad del IFN $\gamma$  en la regulación de clase II, se realizó en forma paralela un ensayo de ON como ya se ha descrito anteriormente, como se pudo observar en la figura 10, el incremento de clase II y ON se debe al IFN $\gamma$  recombinante, empero, el aumento de la producción de ON también fue menor con respecto a lo observado en las figuras 5 y 8. Lo anterior se explica porque en los primeros ensayos se utilizó sobrenadante fresco y no congelado como en el ensayo de clase II. Esto implica que la actividad biológica del IFN $\gamma$  recombinante se ve afectada por la congelación.

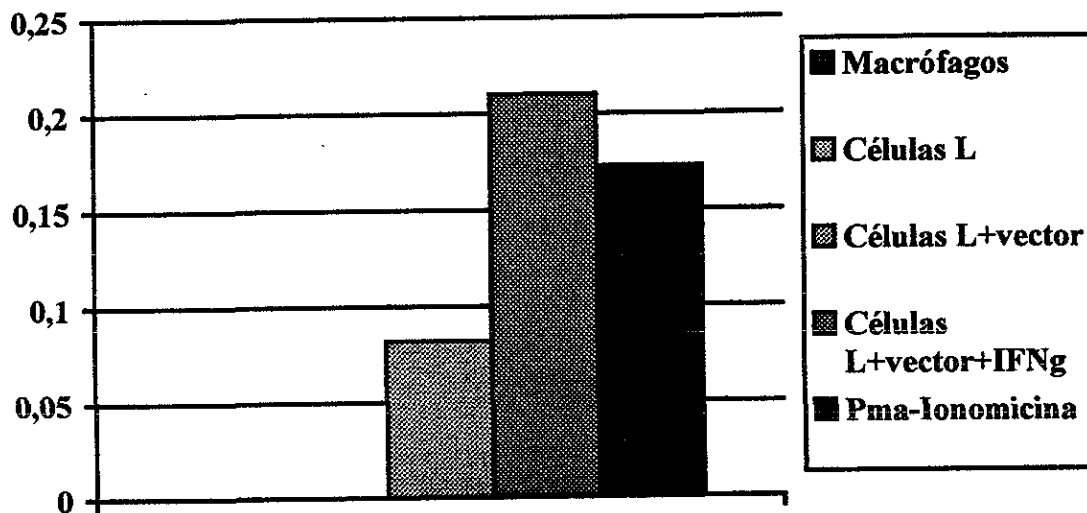
Incremento de moléculas del MHC clase II en porcentaje



Macrófagos estimulados con el 25 % de diferentes sobrenadantes

Figura 9. Incremento en el número de moléculas de clase II de pollo en macrófagos HD11, estimulados durante 48h con 25% del sobrenadante congelado de las células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. La medición de las moléculas se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando como primer anticuerpo el anti-clase II de pollo (TAP1) y como segundo anticuerpo el IgG de cabra anti-ratón conjugadas con isotiocinato de fluoresceína.

D.O. A 540nm de 100 $\mu$ L/ 10<sup>5</sup> Células

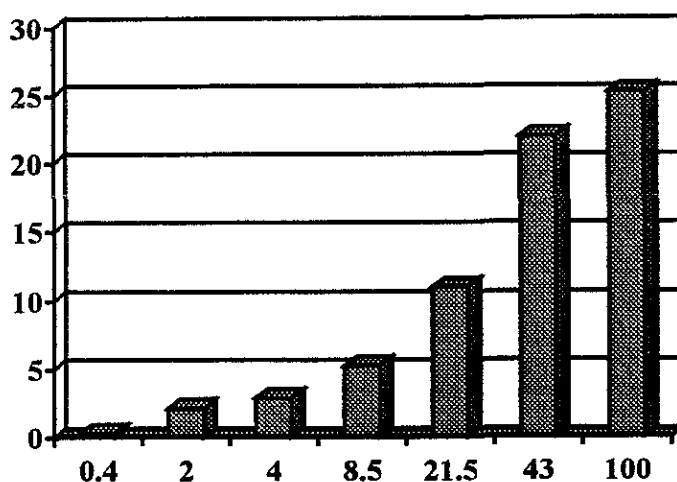


Macrófagos estimulados con el 50 % de diferentes sobrenadantes

Figura 10. Producción de óxido nítrico por macrófagos HD11 activados durante 24h con 50% del sobrenadante fresco de células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. La producción de ON se evaluó en forma indirecta midiendo la concentración de NO<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo, a través de la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess y cuantificados a 540nm. Gráfica como control del sobrenadante usado en el ensayo de clase II.

**Capacidad fagocítica de los macrófagos HD11.** Para evaluar el aumento de la actividad bactericida de los macrófagos por  $IFN\gamma$ , primero determinamos la cantidad de bacteria que puede fagocitar la línea de macrófagos HD11, los macrófagos fueron infectados a diferentes concentraciones con la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* (cepa U2) e incubados por 30 minutos a  $41^{\circ}C$ . Después de remover la bacteria extracelular a través de lavados y gentamicina, el número de bacteria intracelular fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia de *S. gallinarum* en agar de McConkey (SIGMA). Como se muestra en la figura 11, los macrófagos fueron capaces de fagocitar la *S. gallinarum* a partir de 0.4 hasta 100 UFC con un comportamiento directamente proporcional a la concentración de bacteria. Sin embargo, la capacidad fagocítica por los macrófagos fue baja, aun con la concentración más alta de la bacteria de 1:100; donde la relación real por célula fue de aproximadamente 1 bacteria por cada 5 macrófagos.

*Salmonella* intracelular en UFC x  $10^4$



Relación de las UFC adicionadas por macrófago

Figura 11. Capacidad de los macrófagos HD11 de pollo para fagocitar la cepa silvestre de *S. gallinarum* U2. Los macrófagos fueron infectados con diferentes

concentraciones de bacteria por 30 minutos a 41°C. Después de eliminar la bacteria extracelular las células fueron lisadas para recuperar la bacteria viva. La bacteria fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar MacConkey.

**Supervivencia y multiplicación de *S. gallinarum* dentro de los macrófagos HD11.** La *Salmonella* como bacteria intracelular tiene la habilidad de la supervivencia y la multiplicación dentro de los macrófagos del ratón. Ahora ya sabíamos que los macrófagos HD11 podían fagocitar a *S. gallinarum*, pero era necesario saber si la bacteria podía vivir y multiplicarse. Para ello, los macrófagos HD11 fueron infectados con la máxima relación de fagocitosis (1:100) e incubados por 30 minutos a 41°C. Después de remover la bacteria extracelular a través de lavados y gentamicina, los macrófagos fueron lisados a tiempos de 2, 4, y 24 horas posteriores a la fagocitosis con SAF con 20% de Triton, el número de bacteria intracelular fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia de *S. gallinarum* en agar de McConkey (SIGMA). Como se muestra en la figura 12, la bacteria fue capaz de iniciar una replicación en las primeras 2 horas posteriores a la fagocitosis, pero después la bacteria comenzó a decrecer paulatinamente hasta detectar un 4.4% de la bacteria inicialmente fagocitada a las 24h. Lo que indica que la *Salmonella* es capaz de multiplicarse y vivir dentro del macrófago. Sin embargo, su capacidad de multiplicación y de supervivencia se vio limitada por el macrófago.

*Salmonella* intracelular en UFC x 10<sup>4</sup>

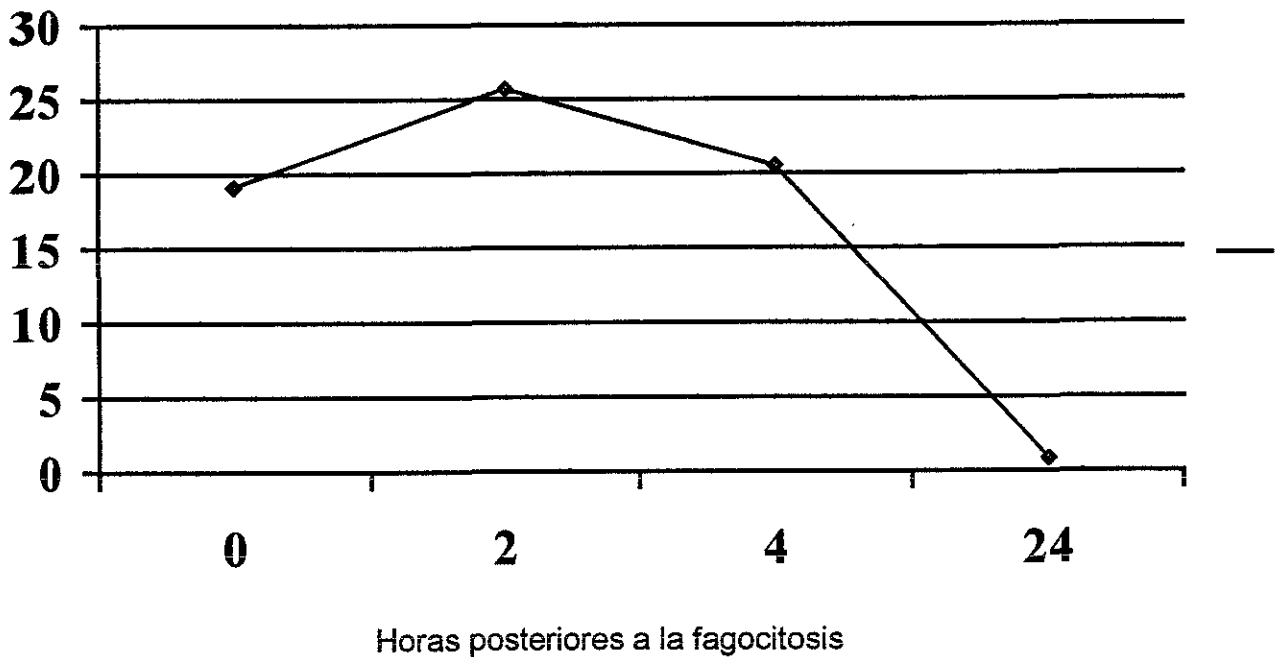
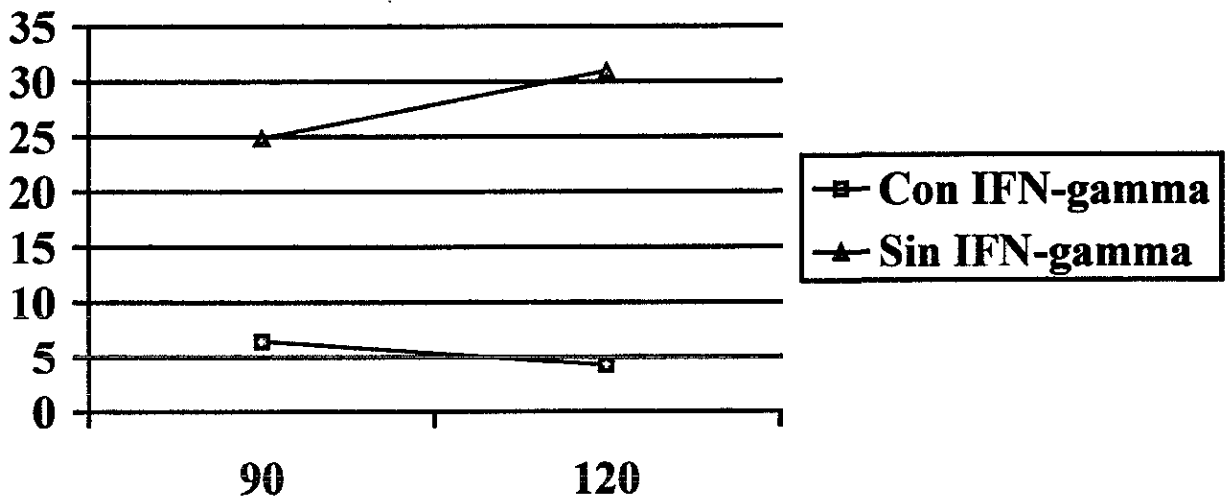


Figura 12. Actividad bactericida de los macrófagos HD11 de pollo hacia la cepa silvestre de *S. gallinarum* U2.  $1.4 \times 10^6$  macrófagos (MØ) fueron infectados a una relación célula con bacteria de 1:100. Después de la fagocitosis y remoción de bacteria extracelular. Los MØ fueron lisados a diferentes tiempos para recuperar la bacteria viva. La bacteria fue cuantificada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar MacConkey.

**Incremento de la actividad bactericida de los macrófagos de pollo vs *S. gallinarum* U2.** El incremento de ON y moléculas de clase II son funciones biológicas características del IFN $\gamma$  en los macrófagos. Sin embargo, la activación de los macrófagos por IFN $\gamma$ , solo tiene sentido cuando la célula fagocítica profesional es capaz de destruir a un patógeno y así ayudar a la defensa del huésped. El incremento bactericida de los macrófagos activados por IFN $\gamma$  hacia microorganismos intracelulares como *Salmonella*, es uno de los eventos más

importantes en la defensa del huésped (Kagaya, k., *et al.*, 1989). Como se mostró anteriormente, los macrófagos HD11 son capaces de producir ON por el estímulo de IFN $\gamma$  y *per se* son capaces, aunque a bajos niveles, de fagocitar y permitir la supervivencia y multiplicación de *Salmonella gallinarum*, ahora necesitábamos saber si el IFN $\gamma$  incrementaría la actividad bactericida del macrófago. Para esto, los macrófagos fueron previamente activados durante 24 horas con y sin IFN $\gamma$  recombinante, posteriormente infectados con *S. gallinarum* a una relación de infección de 1:100. Posterior a la fagocitosis, la bacteria extracelular fue removida por lavados con SAF a 41°C e incubadas con medio de cultivo con gentamicina. A los 90 y 120 minutos posteriores a la fagocitosis las células fueron lavadas 2 veces con medio DMEM para remover la gentamicina, y seguidamente fueron lisadas para recuperar la bacteria intracelular y sembradas en agar de McConkey. En la figura 13 se muestra la capacidad del IFN $\gamma$  recombinante para aumentar la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 al disminuir en un 74.18% las UFC a los 90 minutos y un 86.18% más de disminución a los 120 minutos, con respecto a los macrófagos no activados. Como referencia de la actividad bactericida del IFN $\gamma$  recombinante, se realizó en forma paralela un ensayo de ON como ya se ha descrito (Figura 14). Empero, al igual que en el ensayo de clase II, la producción de ON fue baja con relación a lo obtenido por los sobrenadantes frescos (figuras 5 y 8), lo cual se explica por el sobrenadante congelado utilizado.

*Salmonella* intracelular en UFC x 10<sup>4</sup>

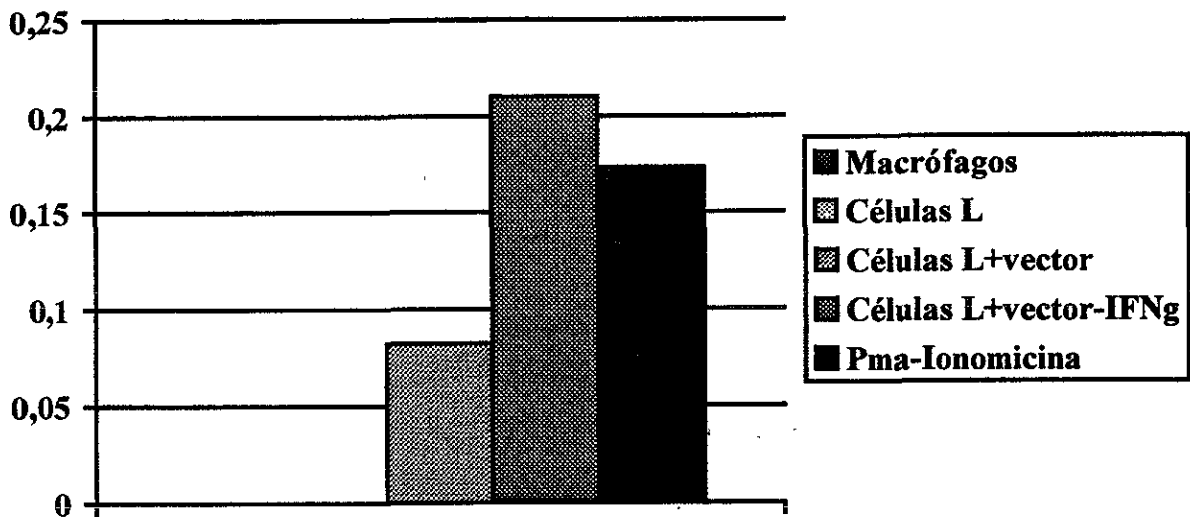


Minutos posteriores a la fagocitosis

Figura 13. Actividad bactericida de los macrófagos HD11 estimulados por el IFN $\gamma$  recombinante de pollo.  $1.3 \times 10^6$  macrófagos fueron incubados por 24h con 30% del sobrenadante congelado de las células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. Posteriormente los macrófagos fueron infectados con *Salmonella gallinarum* cepa U2 a una relación célula:bacteria de 1:100 durante 30 minutos a 41°C. La cantidad de bacteria fue determinada por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en agar McConkey.



D.O. A 540nm de 100 $\mu$ L/ 10<sup>5</sup> Células



Macrófagos estimulados con el 50 % de diferentes sobrenadantes

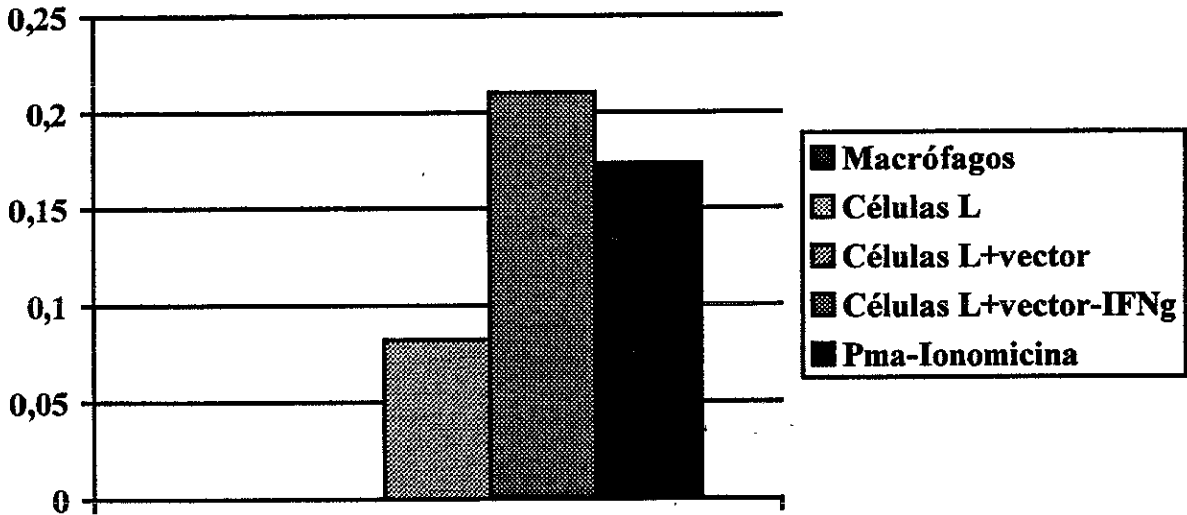
Figura 14. Producción de óxido nítrico por macrófagos HD11 activados durante 24h con 50% del sobrenadante fresco de células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. La producción de ON se evaluó en forma indirecta midiendo la concentración de NO<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo, a través de la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess y cuantificados a 540nm. Gráfica como control del sobrenadante usado en el ensayo bactericida.

## DISCUSIÓN

### ***Obtención del IFN $\gamma$ recombinante.***

A través de la metodología de la TR-RCP se obtuvo el gene de IFN $\gamma$  de pollo a partir de células mononucleares de bazo de pollo estimulados con concanavalina A, el cual fue corroborado por RCP interna y por secuencia. El gene de la clona 13B tuvo una similitud al nivel de los nucleótidos y aminoácidos del 98% y 98.18% respectivamente con respecto a la secuencia reportada (Digby, M.R. y Lowenthal, J.W.,1995) y conservó las diferencias en AA con respecto a las secuencias de IFN $\gamma$  de otras especies de la familia de las *gallinaceas* (Figura 15) ya reportadas

D.O. A 540nm de 100µL/ 10<sup>5</sup> Células



Macrófagos estimulados con el 50 % de diferentes sobrenadantes

Figura 14. Producción de óxido nítrico por macrófagos HD11 activados durante 24h con 50% del sobrenadante fresco de células L transfectadas con el ADNc del IFN $\gamma$  y seleccionadas con geneticina. La producción de ON se evaluó en forma indirecta midiendo la concentración de NO<sub>2</sub> en el sobrenadante del cultivo, a través de la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess y cuantificados a 540nm. Gráfica como control del sobrenadante usado en el ensayo bactericida.

## DISCUSIÓN

### ***Obtención del IFN $\gamma$ recombinante.***

A través de la metodología de la TR-RCP se obtuvo el gene de IFN $\gamma$  de pollo a partir de células mononucleares de bazo de pollo estimulados con concanavalina A, el cual fue corroborado por RCP interna y por secuencia. El gene de la clona 13B tuvo una similitud al nivel de los nucleótidos y aminoácidos del 98% y 98.18% respectivamente con respecto a la secuencia reportada (Digby, M.R. y Lowenthal, J.W.,1995) y conservó las diferencias en AA con respecto a las secuencias de IFN $\gamma$  de otras especies de la familia de las *gallinaceas* (Figura 15) ya reportadas

```

13B: MTCQTYNLFVLSVIMYYGHTASSNLVQLQDDIDKLIKADFNSSHSDVADGG-IIVEKLNWSEKRIILSQIVSMYLEMLENTDKSKPHIKHISEELYTLKNNLPDG
P : MTCQTYNLFVLSVIMYYGHTASSNLVQLQDDIDKLIKADFNSSHSDVADGGPIIVEKLNWTERNEKRIILSQIVSMYLEMLENTDKSKPHIKHISEELYTLKNNLPDG
G : -----FI-----GS-----K-----F-----Q-----C-----RSD-----S-----
F : -----
C : -----N-----
Pa: -----

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de la proteína del IFN $\gamma$  de varias especies aviares. 13B (clona), P (Pollo), G (Gallina de Guinea), F (Faisan), C (Codorniz japonesa), Pa (Pavo doméstico). Las letras enmarcadas en negro indican el cambio de aminoácidos; los guiones (--) indican la misma letra.

por otros investigadores (Kaiser, P., *et al*, 1998). El 2% de la secuencia al nivel de nucleótidos y AA de la clona 13B, que fue diferente a la secuencia original y que correspondió al cambio de 2 AA, consistieron en la ausencia de una prolina<sup>(posición-34)</sup> y el cambio de una serina por una treonina<sup>(posición-44)</sup> en la secuencia de la proteína madura. La sustitución de la prolina en la secuencia de la proteína se debió al codon TnT. Donde la letra n que significa una base no determinada, podría codificar para 4 AA diferentes a la prolina. De los 4 AA que podrían estar presentes en la proteína, solamente la fenilalanina difiere de la prolina por ser químicamente un AA aromático y no imino, sin embargo, esta mutación, dentro de las 4 posibles mutaciones, es la que menos afectaría la estructura y funcionalidad de la proteína, ya que esta mutación no interfiere con un sitio de glicosilación o con el puente disulfuro del carboxilo terminal. Considerando que de los otros 3 AA que pueden sustituir a la prolina, son la tirosina (no polar con una R aromático), serina (polar sin carga con un R hidroxilo) y cisteína (polar sin carga con R de azufre), la proteína entonces tendría cambios en su estructura y funcionalidad, empero, debido a la inducción de la producción de ON y aumento de las moléculas de clase II en los macrófagos HD11 por la proteína recombinante, es probable que la mutación en la prolina por cualquiera de los 4 AA, fuera irrelevante para la funcionalidad de la molécula ó bien que esta mutación fuera un artefacto causado por una mala purificación del ADN del plásmido, que interfiriera con la reacción de secuenciación. Para la mutación de la serina por la treonina en la posición 44 de la secuencia completa de la proteína, la mutación no implicaría cambios en su estructura y funcionalidad, debido a que ambos AA comparten las mismas características fisicoquímicas.

Aunque hubo un intercambio en la posición de los nucleótidos citocina<sup>posición-41</sup> y timina<sup>posición-42</sup> por timina<sup>posición-41</sup> y citocina<sup>posición-42</sup> de la secuencia señal, esto no representó el cambio del AA valina<sup>posición-13</sup> del péptido señal, por lo que el intercambio de las bases es irrelevante.

Dada la actividad biológica de la molécula de IFN $\gamma$  y la similitud del 98% en bases y AA con respecto a la molécula y secuencia original (Digby, M.R. y Lowenthal,

J.W. 1995), también ya confirmada por otros investigadores (Weining, K.C., *et al*, 1996; Song, K.D., *et al*, 1997); entonces nuestra secuencia tendría esas mutaciones por una mala calidad en la limpieza del ADN de plásmido que intervino en la reacción de secuenciación, ó a la polimerasa usada durante la RCP. Por cualquier enfoque, la molécula con actividad biológica, obtenida a través de ingeniería genética a partir de células mononucleares de pollo estimuladas por concanavalina-A es IFN $\gamma$ .

### ***Infecciones por Salmonella en los pollos.***

Los pollos son comensales a la infección por *Salmonella* después de los 7 días de edad debido a que incrementan su resistencia natural hacia la bacteria, este mecanismo de resistencia aun no ha sido dilucidado. Pero se sabe que cuando la bacteria es administrada intravenosamente y alcanza el sistema reticuloendotelial, este rápidamente controla a la bacteria *per se* (Girard-Santosuosso, O., *et al*, 1998). Lo mismo es observado en los pollos que son retados con *Salmonella enteritidis* por la vía natural (Gary García, preparación del manuscrito). Se sabe que las células fagocíticas del bazo, los monocitos y polimorfonucleares de sangre periférica de pollos fagocitan y tienen una actividad bactericida contra la *Salmonella* (Kodama, H., *et al*, 1976; Stabler, J.G., *et al*, 1994), lo que a sugerido que éstas células participarían en la resistencia del huésped hacia la bacteria como es bien conocido en los ratones. Sin embargo, el papel central del macrófago ante la infección por *S. gallinaum* no ha sido estudiado. Para demostrar esto, primero se puso de manifiesto que los macrófagos de pollo en reposo, fagocitan y permiten la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2, los resultados del estudio nos dicen que éstas características también suceden tal y como se conocen en otros modelos animales como el ratón. Sin embargo, estas características tienen sus particularidades.

### **Fagocitosis.**

Cuando se determinó la capacidad fagocítica de los macrófagos HD11 hacia *S. gallinarum*, nos llamó la atención la pobre capacidad fagocítica de estos macrófagos hacia la *Salmonella* específica de la especie. Una de las características más importantes observadas en el ensayo de la fagocitosis fue su dependencia a las altas temperaturas a las que se llevó la infección. Únicamente se logró una aceptable fagocitosis cuando el ensayo se realizó a la temperatura corporal de los pollos (41°C), ya que los ensayos realizados por debajo de los 39°C, el mecanismo de fagocitosis se vio disminuido hasta en un 90% (datos no mostrados), sugiriendo así que los mecanismos de internalización de la bacteria se llevan a cabo a temperaturas más elevadas. Considerando que en el ensayo de infección la bacteria es específica para la especie *Gallus gallus*, probablemente la baja fagocitosis por parte de los macrófagos se deba al tejido de origen, ya que sabemos que la capacidad de fagocitosis y el comportamiento durante la infección varían entre las diferentes poblaciones de macrófagos (Buchmeier, N.A., y Heffron., F., 1989). Las diferencias en los mecanismos de fagocitosis de los diversos orígenes del macrófago, así como las moléculas de reconocimiento e internalización hacia *Salmonella* aun no han sido bien esclarecidos, sin embargo, sabemos que las diferentes poblaciones de macrófagos expresan o no ciertas moléculas de membrana que están relacionadas con el reconocimiento de los diversos antígenos de las bacterias, como son a través de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en Inglés); de receptor de manosa, del receptor del complemento tipo 1, la molécula tipo scavenger llamada MARCO y el de receptores para los Fc (Underhill, D.M., *et al*, 1999; Mcknight, A.J., y Gordon, S., 1998), que explicarán este comportamiento tanto en los mamíferos como en los pollos y los mecanismos compartidos entre las diversas especies animales.

### **Supervivencia y multiplicación.**

*S. gallinarum* fue capaz de multiplicarse y vivir en los macrófagos de pollo como se conoce en otras *Salmonellas* (Maier, T and Oels, H.C. 1972; Lissner, C.R., *et al*,

1983). Sin embargo, estas dos características de *S. gallinarum*, tienen un comportamiento algo diferente a lo conocido en los macrófagos de ratón. Como se observó en la figura 12, la bacteria fue capaz de iniciar su multiplicación una vez internalizada en el macrófago durante las primeras 2 horas, para posteriormente decrecer en las siguientes 22 horas, esta característica es opuesta a lo observado en diferentes poblaciones de macrófagos de ratón infectados con la cepa silvestre de *S. typhimurium*. En la línea de macrófagos J774 la *Salmonella* decrece en la primera hora posterior a la fagocitosis y posteriormente comienza su multiplicación ascendente en las próximas 23 horas, esto no sucede en los macrófagos provenientes de cultivo primario de bazo, médula ósea, lavado peritoneal y por los obtenidos a través de la estimulación con peptona administrada intraperitonealmente en los ratones BALB/c (*Ity*<sup>s</sup>), donde la bacteria básicamente sobrevive sin prácticamente multiplicarse o decrecer (Buchmeier, N.A. and Heffron, F. 1989). En estudios con macrófagos de bazo y peritoneo provenientes de ratones C3H/HeN (*Ity*) infectados con la cepa silvestre de *S. typhimurium* (cepa TML) donde la bacteria vive y se multiplica alrededor de las 24 horas posteriores a la infección, tampoco se observó un comportamiento similar a la supervivencia y multiplicación de *S. gallinarum* U2 en los macrófagos HD11. Sin embargo, en ese mismo estudio los macrófagos residentes de peritoneo de ratones SWR/J (*Ity*) mostraron tener la capacidad bactericida hacia la cepa silvestre TML de *S. typhimurium* desde la fagocitosis hasta las siguientes 24 horas, lo que muestra una parcial semejanza con lo observado en este estudio (Lissner, Ch. R., *et al.*, 1983).

### **Mecanismos que permiten la supervivencia y multiplicación de *Salmonella* en los macrófagos.**

Aunque en *Salmonella gallinarum* no se han descrito estos mecanismos, es probable que ellos tengan una total o parcial participación dentro del macrófago de pollo, y que su expresión y funcionalidad requiera de temperaturas cercanas a 41°C como se observó en este estudio. El primer paso para la supervivencia y

multiplicación de la *Salmonella* dentro de los compartimentos del macrófago, es la acidificación de los compartimentos (Rathman, M., *et al*, 1996). Posteriormente la participación de las proteínas del sistema de secreción tipo III, de la isla de patogenicidad 2 que se expresan dentro de los macrófagos y que interactúan con las proteínas del macrófago para permitir su supervivencia y multiplicación (Hensel, M., *et al*, 1998; Cirillo, D.M., *et al*, 1998), como es la proteína codificada por el gene SseB (Beuzón, C.R., *et al*, 1999) y el gene ssaR (Pfeifer, C.G., *et al*, 1999) de la I.Pg tipo 2, de las cuales aun falta conocer la caracterización de la proteína y su explicación biológica molecular en el ratón y más aun en el pollo. La participación de las proteínas de la I.Pg tipo 3 en la supervivencia y multiplicación dentro del macrófago tampoco se conocen, pero se sabe que están relacionadas con la provisión de productos esenciales para el crecimiento bajo condiciones limitantes de  $Mg^{2+}$  (Blanc-Potard, A.B., *et al*, 1999; Blanc-Potard, A.B., y Groisman, E.A., 1997).

Los mecanismos que contribuyen a la supervivencia y multiplicación intracelular, obedecen a un sistema de regulación, como es el regulador maestro PhoP/PhoQ. PhoQ es una proteína membranal con actividad de cinasa que transfiere un fosfato al amino terminal del PhoP cuando las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  son muy bajas. El PhoP fosforilado se une al promotor de por lo menos 40 genes que codifican proteínas que permiten a la bacteria la supervivencia intracelular, la defensa contra las defensinas (Miller, S.I., *et al*, 1990), los péptidos catiónicos microbicidas, al pH ácido y el aumento de proteínas transportadoras de magnesio con alta afinidad entre otras funciones (Ernest, R.K., *et al*, 1999).

Existen otros mecanismos implicados en la supervivencia como es la participación de la superóxido dismutasa que tiene *S. typhimurium* como medio de defensa ante los mecanismos bactericidas dependientes de  $O_2$  por la oxidasa dependiente de NADPH del fagocito de ratón, este mecanismo lo logra, a través de la transformación inmediata del  $O_2^-$  en  $H_2O$ , evitando así la cascada de los reactivos intermediarios del  $O_2$  (Anne De Groote, M., *et al*, 1997). Sin embargo, no sabemos



si *Salmonella gallinarum* tenga este mecanismo y por quién es regulado en *S. typhimurium*.

Otro de los mecanismos involucrados en el macrófago relacionados con la supervivencia y multiplicación de la bacteria, es un mecanismo que no depende de la bacteria si no del macrófago, éste es el caso de la molécula transmembranal transportadora de iones del fagosoma conocida como la proteína del macrófago asociada a la resistencia natural tipo 1 (Nramp-1, por sus siglas en Inglés) (Lissner, Ch.R., *et al*, 1983; Vidal, S., *et al*, 1995), que al menos en el ratón a mostrado estar asociada a una mutación de una Glicina<sup>169</sup> (*Ity*<sup>l</sup>) por el ácido aspártico<sup>169</sup> (*Ity*<sup>s</sup>) (Malo, D., *et al*, 1994) y que se cree que influye en el secuestro de iones esenciales para la supervivencia de la bacteria (Kuhn, D.E., 1999) y a la concentración de nitritos y nitratos (Vidal, S.M., *et al*, 1993; Nathan, C., 1995). Sin embargo, en los pollos esta molécula no ha mostrado tener *in vivo* un papel tan importante como en el ratón lo que ha sugerido la participación de otros mecanismos más importantes (Hu, J., *et al*, 1997).

El bloqueo de la fusión del lisosoma al fagosoma, para evitar los mecanismos con actividad bactericida independiente de O<sub>2</sub> y N, es un evento que se ha sugerido por algunos investigadores (Buchmeier, N., and Heffron, F. 1991; Uchiya, K., *et al*, 1999), aunque existe evidencia opuesta a ello (Ishibashi, Y., y Arai, T. 1995; Oh, Y., *et al*, 1996). Lo cierto es que a pesar de que el lisosoma lograra fusionarse, la bacteria es capaz de utilizar mecanismos alternativos de defensa contra el contenido enzimático del lisosoma. Uno de estos mecanismos es la acilación del LPS de la membrana externa de la *Salmonella* regulada por PhoQ/PhoP, que evita el anclaje de los péptidos catiónicos antimicrobianos y por lo tanto el bloque de la formación de poros en su membrana (Guo, L., *et al*, 1998).

A pesar de que aun no se ha determinado la presencia de estos genes, proteínas y mecanismos en *Salmonella gallinarum*, sabemos que su virulencia en los pollos susceptibles, radica en un plásmido de 85Kb y en los genes del cromosoma, que estan involucrados en provocar la muerte y en permitir la supervivencia y

multiplicación dentro del bazo e hígado (Barrow, P.A., *et al*, 1987; Barrow, P.A., y Lovell, M.A., 1989; Barrow, P.A., 1990). Sin embargo, la supervivencia y multiplicación de *S. gallinarum* o *S. pullorum* dentro del sistema reticuloendotelial del ratón se ve afectada considerablemente y no son capaces de matar a los ratones o de lesionar sus tejidos (Barrow, P.A., *et al*, 1987; Barrow, P.A., y Lovell, M.A., 1989), ni tampoco de vivir y multiplicarse en los macrófagos de ratón (Pascopella, L., *et al*, 1995). Probablemente las *Salmonellas* que afectan a las *Gallinaceas* posean los mismos mecanismos de virulencia que las de su mismo género, pero que varias de sus proteínas de virulencia estarían adaptadas a las proteínas de los fagocitos profesionales de pollo, y la interacción y funcionalidad de estas proteínas dependerían de una conformación funcional a temperaturas cercanas a los 41°C (Este estudio).

### ***El macrófago activado.***

En el presente trabajo mostramos *in vitro* la primera evidencia del papel del IFN $\gamma$  de pollo en la defensa del huésped hacia un microorganismo intracelular residente en el macrófago. Sabemos que al IFN $\gamma$  se le conoce como una de las moléculas más importantes en la defensa del huésped hacia microorganismos intracelulares como *Salmonella*, por disminuir la muerte del ratón infectado con una cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* (Matsumara, H., *et al*, 1990). Esta característica en el ratón, se debe en parte a que el IFN $\gamma$  activa los mecanismos bactericidas del macrófago (Kagaya, K., *et al*, 1989).

En el ratón, aun cuando la *Salmonella* logra evadir los mecanismos bactericidas del macrófago para lograr la supervivencia. Ella finalmente será controlada por el fagocito siempre y cuando sea activado por el IFN $\gamma$ . Como se observó en este estudio, los macrófagos HD11 responden al estímulo de IFN $\gamma$ , incrementando su actividad bactericida hacia *S. gallinarum* U2 como se conoce en los ratones (Kagaya, K., *et al*, 1989) lo que significa que entre los pollos y mamíferos están

conservados los mecanismos bactericidas del macrófago y que estos son expresados en respuesta al estímulo por IFN $\gamma$ .

Uno de los mecanismos que se ha demostrado, tienen participación en la destrucción de la bacteria, son los metabolitos intermediarios de N (Boehm, U., *et al*, 1997; Shiloh, M.U., *et al*, 1999) que son producidos por la síntesis *de novo* de la enzima iNOs en respuesta a la señalización de IFN $\gamma$  (Cassatella, M.A., *et al*, 1990; Xie, Q.W., *et al*, 1992). En diferentes poblaciones de macrófagos de pollo ya se ha descrito la presencia de esta enzima, su síntesis *de novo* y la producción de ON por el estímulo del LPS (Hussain, I, y Qureshi, M.A., 1997), como se ha reportado y como se observó en este estudio, el IFN $\gamma$  induce la producción de ON (Digby, M.R., y Lowenthal, J.W., 1995; Weining, K.C., *et al*, 1996) lo que establece este mecanismo como uno de los participantes en la actividad bactericida en el pollo y conservado con respecto a los mamíferos.

La existencia del mecanismo dependiente de O $_2$  en los pollos, se ha demostrado en las células polimorfonucleares, no así en el macrófago (Stabler, J.G., *et al*, 1994). Sin embargo, dado el hecho de su necesaria participación en conjunto con los mecanismos dependientes de N para la actividad bactericida y su inducción a través de IFN $\gamma$  en el ratón (Boehm, U., *et al*, 1997; Shiloh, M.U., *et al*, 1999), la alta actividad bactericida observada por los macrófagos HD11 probablemente se debe a su existencia y participación.

Ambos mecanismos inducidos por IFN $\gamma$ , pueden alcanzar niveles más altos de expresión cuando se dan otros estímulos junto con la señal de IFN $\gamma$ . Uno de estos estímulos sinérgicos que ha mostrado aumentar la actividad bactericida del macrófago del ratón es el TNF $\alpha$  (Nauciel, C., y Espinasse-Maes, F., 1992; Gulig, P.A., *et al*, 1997). El mecanismo de señalización aun no está del todo esclarecido, pero el efecto sinérgico de ambas citocinas influye en la expresión del ARNm de la subunidad p67 del citocromo b558 del estallido respiratorio (Gupta, J.W., *et al*, 1992); mientras tanto la regulación de la producción del ON por IFN $\gamma$  se vería más

aumentada por el LPS y el TNF, ya que ambos traducen señal a través del sitio de reconocimiento para el NF $\kappa$ B, el TNF hacia los dos elementos de respuesta del TNF, que están ubicados en la región promotora de iNOS (Xie, Q.W., *et al*, 1993) y la fosforilación de la serina del Stat-1 por LPS (Kovarik, P., *et al*, 1998). Recientemente se ha detectado que el LPS induce en los macrófagos de pollo la secreción de una proteína de 81 kda que induce la producción de ON, aumenta la expresión de la molécula de clase II e induce cambios morfológicos en la línea de macrófago de bazo de pollo MQ-NCSU, y que además se aumentan por el estímulo del IFN $\gamma$ , tal proteína se ha sugerido que es del tipo TNF (Rautenschlein, S., *et al*, 1999). Con la disminución de casi un 90% de *S. gallinarum* por los macrófagos HD11 estimulados por IFN $\gamma$ , sería muy probable que los macrófagos HD11 disminuyeran la bacteria en casi un 100% por un estímulo sinérgico del IFN $\gamma$  con TNF $\alpha$  y LPS. Lo cual podría darnos una explicación de lo que sucede *in vivo* con los pollos naturalmente resistentes a *Salmonella*.

La participación de la molécula Nramp-1, aumentada por la regulación del IFN $\gamma$  y por el LPS en los macrófagos de ratón, es otro de los mecanismos que participan en el control de las infecciones intracelulares (Govoni, G., *et al*, 1995), aunque en estudios *in vivo* en el pollo, esta molécula únicamente ha mostrado una participación parcial en el control de la *Salmonella* (Hu, J., *et al*, 1997), seguramente hay una contribución en la actividad bactericida de los macrófagos HD11 estimulados por IFN $\gamma$ , dado que la región transcripcional de la Nramp-1 de pollo tiene elementos de respuesta al IFN $\gamma$  (Hu, J., *et al*, 1997).

El papel de los mecanismos independientes de O<sub>2</sub> y N como las proteínas microbicidas contra *Salmonella* inducidas por IFN $\gamma$  en el ratón (Hiemstra, P.S., *et al*, 1999) y enzimas con actividad reductora de las puentes disulfuro (Arunachalam, B., *et al*, 2000), sería otro de los mecanismos involucrados en la actividad bactericida de los macrófagos HD11, sin embargo, su expresión y

colaboración aun son desconocidas en los pollos y recientemente más estudiado en los ratones.

Los resultados *in vitro* aquí obtenidos y con la pregunta sin contestar a cerca de ¿cuales son los mecanismos de resistencia naturales de los pollos leghorn hacia *Salmonella*? Podríamos pensar entonces que el IFN $\gamma$  podría tener una participación crucial en el mecanismo de resistencia hacia *Salmonella* en los pollos mayores de 7 días de edad, debido a que en los ratones se ha mostrado evidencia de la presencia temprana de IFN $\gamma$  en las primeras horas posteriores a la infección con *Salmonella* (Nauciel, Ch. 1990) y porque también se ha visto su participación temprana ante la infección al disminuir la multiplicación de la bacteria (Hess, J., *et al*, 1996). Entonces los macrófagos de los pollos expresarían tempranamente IL-12, IL-18 e IL-15 que son necesarias para inducir IFN $\gamma$  a través de las células NK (Okamura, H., *et al*, 1998; Hirose, K., *et al*, 1999; Nishimura, H., *et al*, 2000) y también la secreción de TNF $\alpha$  que junto con el IFN $\gamma$  incrementaría sustancialmente la actividad bactericida del macrófago hacia *Salmonella*. Sin embargo, tendría que existir al mismo tiempo una baja expresión de citocinas antagónicas como la IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento de transformación (TGF $\beta$ , por sus siglas en Inglés) que permitiéran expresar el perfil de citocinas inflamatorias.

También la participación de otros mecanismos independientes al IFN $\gamma$  podrían estar involucrados en los mecanismos de resistencia natural innata del pollo como es el C3b del complemento que después de unirse al LPS de la *Salmonella*, se une a su receptor en el macrófago de ratón y traduce señal para la fagocitosis y lisis de la bacteria a través de un mecanismo no conocido (Nishikawa, F., *et al*, 1998). El otro mecanismo en el macrófago de ratón, es a través de la interacción del LPS con el CD14 a través de la proteína que se une al LPS (LBP, por sus siglas en Inglés), este complejo se une a la molécula TLR4 en la membrana del

macrófago que es internalizada al fagosoma y a su vez traduce señales para inducir la producción de ON, TNF $\alpha$  e IL-6 (Jack, R.S., *et al*, 1997; Amura, C.R., *et al*, 1997; Takeuchi, O., *et al*, 1999; Underhill, D.M., *et al*, 1999), en donde el TNF $\alpha$  es sinérgico con el IFN $\gamma$ . Sin embargo, en los macrófagos de peritoneo de humano, la señal que traduce del LPS a través de la LBP no induce la expresión del TNF $\alpha$  (Amura, C.R., *et al*, 1998),

Aunque estos mecanismos aun no son descritos en los pollos, seguramente estan conservados con respecto a los mamíferos y tienen un papel importante en la susceptibilidad y resistencia natural innata del pollo hacia *Salmonella*.

## CONCLUSIONES

1. Los macrófagos en reposo HD11 controlan la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *S. gallinarum* (cepa U2).
2. Los resultados en la producción de ON y el incremento de la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 estimulados por IFN $\gamma$ , muestran la relevancia *in vitro* de esta molécula en la defensa del pollo, al controlar la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2.
3. El IFN $\gamma$  de pollo conserva las mismas actividades biológicas descritas para el IFN $\gamma$  de otras especies animales.

## PERSPECTIVAS

1. El primer paso que estamos dando, es la obtención de anticuerpos monoclonales que neutralicen la actividad biológica del IFN $\gamma$ , que nos permita

macrófago que es internalizada al fagosoma y a su vez traduce señales para inducir la producción de ON, TNF $\alpha$  e IL-6 (Jack, R.S., *et al*, 1997; Amura, C.R., *et al*, 1997; Takeuchi, O., *et al*, 1999; Underhill, D.M., *et al*, 1999), en donde el TNF $\alpha$  es sinérgico con el IFN $\gamma$ . Sin embargo, en los macrófagos de peritoneo de humano, la señal que traduce del LPS a través de la LBP no induce la expresión del TNF $\alpha$  (Amura, C.R., *et al*, 1998),

Aunque estos mecanismos aun no son descritos en los pollos, seguramente estan conservados con respecto a los mamíferos y tienen un papel importante en la susceptibilidad y resistencia natural innata del pollo hacia *Salmonella*.

## CONCLUSIONES

1. Los macrófagos en reposo HD11 controlan la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *S. gallinarum* (cepa U2).
2. Los resultados en la producción de ON y el incremento de la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 estimulados por IFN $\gamma$ , muestran la relevancia *in vitro* de esta molécula en la defensa del pollo, al controlar la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2.
3. El IFN $\gamma$  de pollo conserva las mismas actividades biológicas descritas para el IFN $\gamma$  de otras especies animales.

## PERSPECTIVAS

1. El primer paso que estamos dando, es la obtención de anticuerpos monoclonales que neutralicen la actividad biológica del IFN $\gamma$ , que nos permita

macrófago que es internalizada al fagosoma y a su vez traduce señales para inducir la producción de ON, TNF $\alpha$  e IL-6 (Jack, R.S., *et al*, 1997; Amura, C.R., *et al*, 1997; Takeuchi, O., *et al*, 1999; Underhill, D.M., *et al*, 1999), en donde el TNF $\alpha$  es sinérgico con el IFN $\gamma$ . Sin embargo, en los macrófagos de peritoneo de humano, la señal que traduce del LPS a través de la LBP no induce la expresión del TNF $\alpha$  (Amura, C.R., *et al*, 1998),

Aunque estos mecanismos aun no son descritos en los pollos, seguramente estan conservados con respecto a los mamíferos y tienen un papel importante en la susceptibilidad y resistencia natural innata del pollo hacia *Salmonella*.

## CONCLUSIONES

1. Los macrófagos en reposo HD11 controlan la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *S. gallinarum* (cepa U2).
2. Los resultados en la producción de ON y el incremento de la capacidad bactericida de los macrófagos HD11 estimulados por IFN $\gamma$ , muestran la relevancia *in vitro* de esta molécula en la defensa del pollo, al controlar la supervivencia y multiplicación de la cepa silvestre de *Salmonella gallinarum* U2.
3. El IFN $\gamma$  de pollo conserva las mismas actividades biológicas descritas para el IFN $\gamma$  de otras especies animales.

## PERSPECTIVAS

1. El primer paso que estamos dando, es la obtención de anticuerpos monoclonales que neutralicen la actividad biológica del IFN $\gamma$ , que nos permita



conocer *in vivo* su relevancia ante las infecciones intracelulares como *Salmonella* y su relación con la resistencia natural del pollo.

2. Al mismo tiempo estamos estudiando el comportamiento de diferentes *Salmonellas* en los compartimentos intracelulares de estos macrófagos que nos permitan entender el mecanismo de resistencia natural de los pollos a esta bacteria.

## LITERATURA CITADA

Amura C.R., Li-Chun C., Hirohashi N., Lei M., y Morrison, D. 1997. Two functionally independent pathways for lipopolysaccharide-dependent activation of mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 159:5079-5083

Amura C.R., Kamei T., Ito N., Soares M.J., y Morrison D.C., 1998. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse by LPS-binding proteins. *J. Immunol.* 161:2552-2560

Anne De Groote M., Ochsner U.A., Shiloh M.U., Nathan C., McCord J.M., Dinauer M.C., Libby S.J., Vazquez-Torres A., Xu, Y., y Fang, F.C., 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13997-14001.

Arase H, Arase N, y Saito T., 1996. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J. Exp. Med.* 183:2391-2396

Arunachalam, B., Phan, U.T., Geuze, H.J., y Cresswell, P., 2000. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:745-750

Bainton, D., 1981. The discovery of lysosomes. *J. Cell. Biol.* 91:66s-76s

Barrow P.A., Simpson J.M., Lovell M.A., y Binns M.M., 1987. Contribution of *Salmonella* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect. Immun.* 55:388-392

Barrow P.A., y Lovell M.A., 1989. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 57:3136-3141

Barrow P.A., 1990. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* 58:2283-2288

Barrow P.A., Huggins M.B., y Lovell M.A., 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Inf. Immun.* 62:4602-4610.

Baker, S.J., Daniels, C., y Morona, R., 1997. PhoP/Q regulated genes in *Salmonella typhi*: identification of melittin sensitive mutants. *Microbial Patho.* 22:165-179

Beuzón C.R., Banks G., Deiwick J., Hensel M., y Holden D.W., 1999. PH-dependant secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 33:806-816

Blanc-Potard, A.B., y Groisman, E.A., 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 16:5376-5385

Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J., Groisman, E.A., 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 181:998-1004

Boehm U., Klamp T., Groot, J., y Howard C., 1997. Cellular responses to Interferon- $\gamma$ . *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-795

Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Loenstrein C., Reed R.R., y Snyder S.H., 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718

Buchmeier N.A, Heffron F., 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* 57:1-7

Buchmeier N., y Heffron F., 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59:2232-2238.

Cassatella M.A., Hartman L., Perussia B., y Trinchieri G., 1989. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemia myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 83:1570-1579

Cassatella M.A., Bazzoni F., Flynn R.M., Dusi S., Trinchieri G., y Rossi F., 1990. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability: studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J. Biol. Chem.* 265:20241-20246

Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M. and Falkow, S., 1998. Macrophage-dependant induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* 30:175-188.

Cooper G.L., Venables L.M., Woodward M.J., y Hormaeche C.E., 1994. Invasiveness and persistence of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and a genetically defined *S. enteritidis* aro A strain in young chickens. *Inf. And Immunity* 62(11):4739-4746.

Digby M.R., y Lowenthal J.W., 1995. Cloning and expression of the chicken interferon- $\gamma$  gene. *J. Interferon Cytokine Res.* 15:939-945

Ernest R.K., Guina T., y Miller S.I., 1999. How intracellular bacteria survive: Surface modifications that promote resistance to host innate immune responses *J. Inf. Dis.* 179(Suppl 2):s326-330

Fields, P.I., Swanson, C.G., Haidaris,, C.G., y Heffron, F., 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5189-5193

Finlay, B.B., y Cossart, P., 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogen. *Science* 276:718-725

Gast R.K., y Bears C.W., 1990. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *A. Dis.* 34:991-993

Girard-Santosuosso O., Menanteau P., Ducher-Suchaux M., Berthelot F., Mompарт F., Protais J., Colin P., Guillot J.F., Beaumont C., Lantier F., 1998. Variability in the resistance of four chicken lines to experimental intravenous infection with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *A. Dis.* 42:462-469

Green L.A., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishock J.S., y Tannenbaum., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1256:131-138

Guilloteau, L.A., Wallis, T.S., Gautier, A.V., MaCintyre, S., Platt, D.J., y Lax, A.J., 1996. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lyses of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect. Immun.* 64:3385-3393

Gunn, J.S., y Miller, S.I., 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* 178:6857-6864

Gulig P.A., Doyle T.J., Clare-Salzler M.J., Maiese R.L., Matsui H., 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv-*Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of  $\gamma$ -interferon and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Infect. Immun.* 65:5191-5197

Gupta J.W., Kubin M., Hartman L., Cassatella M., y Trinchieri G., 1992. Induction of expression of genes encoding components of the respiratory burst oxidase during differentiation of human myeloid cell lines induced by tumor necrosis factor and  $\gamma$ -interferon. *Cancer Res.* 52:2530-2537

Guo L., Lim K.B., Poduje C.M., Morad Daniel Gunn J.S., Hackett M., y Miller S., 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95:189-198.

Govoni G., Vidal S., Cellier M., Lepage P., Malo D., y Gros P., 1995. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp-1 gene in macrophages. *Genomics* 27:9-19

Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. and Holden, D.W., 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* 30:163-174.

Hess J., Ladel Ch., Miko D., y Kauffman H.E., 1996. *Salmonella typhimurium* *aroA*- infection in gene-targeted immunodeficient of intracellular location. *J. Immunol.* 156:3321-3326

Hiemstra, P.S., Van Den Barselaar, M. T., Roest, M., Nibbering, P.H., y Van Furth, R., 1999. Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. *J. Leuk. Biol.* 66:423-428.

Hirose K., Nishimura H., Matsuguchi T., y Yoshikai Y., 1999. Endogenous IL-15 might be responsible for early protection by natural killer cells against infection with an avirulent strain of *Salmonella choleraesuis* in mice. *J. Leukoc. Biol.* 66:382-390

Hussain I., y Qureshi M.A., 1997. Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poul. Sci. USA*, 76:1524-1530

Hu J., Bumstead N., Barrow P., Sebastiani G., Olien L., Morgan K., y Malo D., 1997. Resistance to *Salmonellosis* in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. *Genome Res.* 7:693-704.

Isibashi Y., y Arai T. 1995. *Salmonella typhi* does not inhibit phagosome-lysosome fusion in human monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunology and Microbiology.* 12:55-62.

Jack R.S., Fan X., Bernheiden M., Rune G., Ehlers M., Weber A., Kirsch G., Mentel R., Furl B., Freudenberg M., Schmitz G., Stelter F., y Schutt, C., 1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 389:742-745

Jin F., Nathan C., y Ding A., 1999. Paradoxical preservation of a lipopolysaccharide response in C3H/HeJ macrophages: induction of matrix metalloproteinase-9<sup>1</sup>. *J. Immunol.* 162:3596-3600

Johnston, C., Pegues, D.A., Hueck, C.J., Lee, A., y Miller, S.I., 1996. Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol. Microbiol.* 22:715-727

Kagaya K., Watanabe K., Fukazawa Y., 1989. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect. Immun.* 57:609-615

Kaiser P., Sonnemans D., y Smith L.M. 1998. Avian IFN- $\gamma$  genes: Sequence analysis suggests probable cross-species reactivity among Galliforms. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:711-719

Kodama H., Sato K., y Mikami T., 1976. Age-dependent resistance of chickens to *Salmonella in vitro*: phagocytic and bactericidal activities of splenic phagocytes. *Am. J. Vet. Res.* 37:1091-1094.

Kovarik, P., Stoiber, D., Novy, M., y Decker, T., 1998. Stat1 combines signals derived from IFN $\gamma$  and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* 17:36660-3668

Kuhn D.E., Baker B.D., Lafuse W.P., Zwilling B.S., 1999. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J. Leukoc. Biol.* 66:113-119

Lillehoj, H.S., y Choi, K.D., 1998. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *A. Dis.* 42:307-314



Lissner Ch. R., Swanson R.N., O'Brien A.D., 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: Expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in vitro*. J. Immunol. 131:3006-3013

Lowenthal, J.W., Digby, M.R., y York, J.J., 1995. Production of interferon- $\gamma$  by chicken T cells. J. Interferon Cytokine Res. 15:933-938

Maier T., y Oels H.C., 1972. Role of the macrophage in natural resistance to salmonellosis in mice. Infect. Immun. 6:438-441

Malo D., Vogan K., Vidal S., hu J., Cellier M., Schurr E., Funks A., Bumstead N., Morgan K., y Gros P., 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. Genomics 23:51-61

Matsumara H., Onozuka K., Terada Y., Nakano Y., y Nakano M., 1990. Effect of murine recombinant interferon- $\gamma$  in the protection of mice against *Salmonella*. Int. J. Immunopharmacology. 12(1):49-56

MacMicking J., Qiao-wen, y Nathan C., 1997. Antimicrobial actions of NOS2. Annu. Rev. Immunol. 15:333-339.

Mcknight A.J., y Gordon S., 1998. Membrane molecules as differentiation antigens of murine macrophages. Ad. Immunol. 68:271-314

Miller S.I., Pulkkinen W.S., Selsted M.E., y Mekalanos J.J., 1990. Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 58:3706-3710

Miller, S.I., y Mekalanos, J.J., 1990. Constitutive expression of the PhoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol.* 172:2485-2490

Mosmann T.R., y Coffman R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173

Muhlethaler-Mottet, A., Berardino, W.D., Otten, L.A., y Mach, B., 1998. Activation of the MHC Class II Transactivator CIITA by Interferon- $\gamma$  Requires Cooperative Interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157-166.

Nauciel C., y Espinasse-Maes F., 1992. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 60:450-454

Nathan C., 1995. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* 82:873-876

Nauciel Ch., 1990. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J. Immunol.* 145:1265-1269

Nishimura H., Yajima T., Naiki Y., Tsunobuchi H., Itano K., Matsuguchi T., Suzuki M., Ohashi P.S., y Yoshikai Y., 2000. Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. *J. Exp. Med.* 191:157-170

Nishikawa F., Yoshikawa S., Harada H., Kita M., y Kita, E., 1998. The full expression of the *Ity* phenotype in *Ity* mice requires C3 activation by *Salmonella* lipopolysaccharide *Immunology* 95:640-647.

Oh Y., Alpuche-Aranda C., Berthiaume E., Jinks T., Miller S.I., Swanson J.A., 1996. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 64:3877-3883.

Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., Yoshimoto T., y Nkanishi K., 1998. Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18. *Current Opin. Immunol.* 10:259-264

Pascope L., Raupach B., Ghori N., Monack D., Falkow S., y Small P.L.C., 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* 63:4329-4335.

Pfeifer C.G., Marcus S.L., Steele-Mortimer O., Knolder L.A., y Finlay B.B., 1999. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 67:5690-5698

Rathman M., Sjaastad M.D., y Falkow, S., 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in mice murine macrophages. *Infect. Immun.* 64:2765-2773

Rautenschlein S., Subramanian A., y Sharma J.M., 1999. Bioactivities of a tumor necrosis-like factor released by chicken macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 23:629-640

Sekellick, M.J., Lowenthal, J.W., O'neil, T.E., y Marcus, P.I., 1998. Chicken interferon types I and II enhance synergistically the antiviral state and nitric oxide secretion. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:407-414

Song, K.D., Lillehoj, H.S., Choi, K.D., Zarlenga, D., y Han, J.Y., 1997. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58:321-333

Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D.W., 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type II secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:2593-2597

Song, K.D., Lillehoj, H.S., Choi, K.D., Zarlenga, D., y Han, J.Y., 1997. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58:321-333

Smith H.W., y Tucker J.F., 1980. The virulence of Salmonella strains for chickens: their excretion by infected chickens *J. Hyg. Camb.* 4:479-488.

Stabler J.G., McCormick T.W., Powell K.C., y Kogut M.H., 1994. Avian heterophils and monocytes: Phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiology* 38:293-305.

Song, K.D., Lillehoj, H.S., Choi, K.D., Zarlenga, D., y Han, J.Y., 1997. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58:321-333

Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., y Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451

Uchiya K., Barbieri M.A., Funato K., Shah A.H., Stahl P.D., y Groisman E.A., 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* 18:3924-3933.

Underhill D.M., Ozinsky A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson C.B., Bassetti M., y Aderem A., 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates pathogens. *Nature* 401:811-815

Vidal S.M., Malo D., Vogan K., Skamene E., Gros P., 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: identification of a candidate gene for Bcg. *Cell* 73:469-485

Vidal S., Tremblay M.L., Govoni G., Gauthier S., Sebastiani G., Malo D., Skamene E., Olivier M., Jothy S., y Gros P., 1995. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.* 182:655-666.

Weining K.C, Schultz U., Munster U., Kaspers B., y Staeheli P., 1996. Biological properties of recombinant chicken interferon- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* 26:2440-2447

Wong, K.K., McClelland, M., Sollwell, I.C., Sisck, E.C., Thurston, S.J., y Saffer, J.D., 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *Infect. Immun.* 66:3365-3371

Xie Q.W., Whisnant R., y Nathan C., 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independant nitric oxide synthase confers inducibility by interferon- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177:1779-1784

Xie Q-W, Cho H., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., y Nathan C., 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228

Zhang-Barber L., Turner A.K., Dougan G., y Barrow, P.A., 1998. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *salmonella* serotype *gallinarum*. *Vaccine* 16:899-903

Ziprin R.L., Corrier D.E., y Elissalde M.H., 1989. Maturation of resistance to Salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by Cyclosporine. *Poult. Sci.* 68:1637-1642.