



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA
POR *Histophilus somni* EN EL MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA ISABEL FLORES GONZÁLEZ

ASESOR: DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ

Cuatitlán Izcalli, Estado de México.

2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de la respuesta inmune inducida por *Histophilus somni* en el modelo murino.

Que presenta la pasante: María Isabel Flores González

Con número de cuenta: 099509297 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	Dr. Enrique Salas Téllez	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria:

A mis padres María del Socorro González Soberanis y Dionisio Flores Rodríguez que me han dado todo su amor, tiempo, comprensión y toda la paciencia del mundo para finalizar uno de mis grandes sueños, estudiar en la UNAM, ustedes son lo más importante en mi vida y siempre contarán conmigo para todo en cualquier momento.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios y a la vida, por darme las fuerzas y una nueva oportunidad para por fin alcanzar unos de mis sueños.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme formación e información, pero sobre todo por hacerme una mejor persona.

Al Dr. Enrique Salas Téllez y a la Dra. Alma Núñez del Arco por todas sus enseñanzas profesionales y personales, además del apoyo que siempre me han brindado para realizar el Servicio Social y la Tesis.

Al PAPIME PE207414.

Al PIAPIVC20.

Al PIAPI20 de la FESC.

A la Cátedra de Determinación de la producción de biopelículas de diversas especies de Cándida de interés en humanos y animales así como evaluar su comportamiento frente a nuevos compuestos químicos.

A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira y a la Dra. Patricia del Laboratorio de Toxicología por el uso de sus laboratorios en Posgrado de Campo 1.

A todos mis Profesores, que me han brindado sus conocimientos a lo largo del desarrollo de mi carrera.

A la Dra. Jazmín Monroy, coordinadora de QFB y a su secretaria Marthita, muchísimas gracias por la oportunidad que me dieron de finalizar mi trabajo.

A mi generación QFB 26.

A mis amigos, compañeros y conocidos de QFB 24, 25, 27, 28 y en especial a mi amiga de la infancia q.e.p.d. Melissa Galindo Anaya de IA, de todos aprendí algo, tanto académico como de amistad.

A mis amigas y amigos con los que compartimos clases, exámenes, desvelos, trabajos, fiestas, comidas, risas y muchas cosas más. A las chicas superpoderosas: Ana Mera Cerón (Aniux) gracias por tu amistad desde que iniciamos este sueño; Gabriela Sánchez Luis (Doña Estrés) gracias por tu amistad y compartir casi todas nuestras clases; Alejandra Jaimes Rugerio (Ale) gracias por tu amistad y ser nuestra 4ª Mosquetera.

A Mario Patlani Moreno, por enseñarme y ayudarme a realizar esta tesis, muchísimas gracias, además de mi maestro... un amigo.

A Rosa Laura Cruz Ramos (Doña), muchísimas gracias por tu amistad y estar siempre conmigo, en las buenas, en las malas y en las peores.

A Francisco Loera Santoyo (Paco), gracias por heredarme tus cepas de hongos y sacarnos sonrisas con tus ocurrencias.

A las familias: Arzeta González, Bahena González, González Barrientos, González García, González González, Núñez González, Santiago González, Serna González (toda la Gonzalada). A mis cumis América Cinthya Núñez Rojas y Stephany Hernández Núñez por elegirme, al igual que mi cumis María Elena Núñez González, muchas gracias.

A una persona en especial, me enseñaste muchas cosas que nunca olvidaré e indirectamente esta tesis logré terminarla por ti, siempre estarás presente en mi mente y mi corazón, gracias por ello.

ÍNDICE

Tabla de contenido.....	I
Cuadro 1.....	III
Lista de tablas.....	III
Lista de figuras.....	III
Gráfico 1.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
I. Introducción.....	1
1.1 Generalidades.....	3
1.2 <i>Histophilus somni</i> y sus especies.....	4
1.3 Características bacteriológicas de <i>H. somni</i>	4
1.4 Epidemiología.....	6
1.5 Patogenia de <i>H. somni</i>	7
1.6 Factores de virulencia.....	7
1.7 Sintomatología de la epididimitis.....	8
1.8 Diagnóstico y tratamiento de <i>H. somni</i>	9
1.9 Las Citocinas.....	10
1.9.1 Propiedades Generales de las Citocinas.....	11
1.9.2 Citocinas que median y regulan la inmunidad innata.....	13
1.9.3 Interferones tipo I.....	15
1.9.4 Interleucina-12.....	15
1.9.5 Interleucina-15.....	16
1.9.6 Factor de necrosis tumoral.....	16
1.9.7 Interleucina-1.....	19
1.9.8 Interleucina-6.....	20
1.9.9 Quimiocinas.....	21
1.9.10 Interleucina-10.....	21
1.9.11 Citocinas que median y regulan la inmunidad específica.....	22
1.9.12 Interleucina-2.....	22
1.9.13 Interleucina-4.....	24
1.9.14 Factor transformador de crecimiento- β	25
1.9.15 Interferón- γ	27
1.9.16 Linfotoxina.....	29
1.9.17 Interleucina-5.....	30
1.9.18 Otras citocinas de la inmunidad específica.....	31

II. Justificación	34
III. Hipótesis	35
IV. Objetivos	36
V. Material y Métodos	37
5.1 Pruebas de identificación microbiológica y morfología colonial de <i>H. somni</i>	37
5.2 Preparación y obtención del inóculo de <i>H. somni</i>	37
5.3 Protocolo de inmunización.....	37
5.4 Preparación del cultivo primario de células del bazo de ratón.....	38
5.4.1 Cultivo celular.....	38
5.4.2 Inoculación del cultivo primario con células del bazo de ratón.....	39
5.5 Medición de Citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ).....	39
VI. Resultados	41
6.1 Tinción de Gram.....	41
6.2 Pruebas Bioquímicas Primarias y Secundarias de <i>H. somni</i>	41
6.3 Cuantificación de citocinas.....	42
VII. Discusión	44
VIII. Conclusiones	47
IX. Referencias	48
9.1 Referencias bibliográficas y hemerográficas.....	50
9.2 Referencias electrónicas.....	52
X. Anexos	53
10.1 Curva estándar de IL-2.....	53
10.2 Curva estándar de IL-4.....	54
10.3 Curva estándar de IFN- γ	55

CUADRO 1

Cuadro 1 Agentes reportados en casos de Epididimitis ovina.....	3
--	---

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades bioquímicas de microorganismos relacionados de campo y de referencia.....	5
Tabla 2 Características bioquímicas diferenciales principales de las especies más importantes del género <i>Histophilus</i>	5
Tabla 3 Mediadores Reguladores de la Inmunidad Natural.....	14
Tabla 4 Mediadores y Reguladores de la Inmunidad Específica.....	23
Tabla 5 Concentración de Citocinas obtenidas en la medición del sobrenadante de cultivo celular de bazo de ratón.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Receptores y mecanismo de acción del IFN.....	29
Figura 2 Efectos biológicos de Th 1 y Th 2.....	32
Figura 3 Colonias de <i>H. somni</i> en Agar Sangre.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Inducción de IL-2, IL-4 e IFN- γ en células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con células completas de <i>Histophilus somni</i>	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ATCC	(American Type Culture Collection) Colección de Cultivo Tipo Americano
BPGN	Bacilos Pleomórficos Gram Negativos
CMH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
DTH	(Delayed Type Hypersensitivity) Hipersensibilidad de Tipo Tardía o Retardada
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ELISA	(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Prueba Inmunoabsorbente Ligada a Enzimas
Xg	Gravedades
HBSS	Solución Balanceada de Hanks
HRP	Horse Radish Peroxidase Peroxidasa de Rábano
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón-gamma
IL	Interleucina
IM	Vía Intramuscular
Ig	Inmunoglobulina
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
LB	Linfocitos B
LTCD4 ⁺	Linfocitos T CD4 ⁺

LTCD8	Linfocito TCD8
M	Concentración Molar
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
mM	Milimolar
NAD	Nicotinamin Adenin Dinucleótido
NK	(Natural Killer) Célula Asesina Natural
OMP	(Outer Membrana Proteins) Proteínas de Membrana Externa
PBS	(Phosphate Buffer Solution) Solución Amortiguadora de Fosfatos
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reacción en Cadena de la Polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	(Roswell Park Memorial Institute) Medio de Cultivo Celular
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
SSF	Solución Salina Fisiológica
LTh0	Linfocito T progenitor
LTh1	(T helper 1) Linfocitos cooperadores T Tipo 1
LTh2	(T helper 2) Linfocitos cooperadores T Tipo 2
TME o TEME	Meningo encefalitis trombótica / Meningo encefalitis tromboembólica
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UI	Unidades Internacionales

I. INTRODUCCIÓN.

La epididimitis infecciosa en carneros causada por *Histophilus somni*¹ es un grave problema que afecta económicamente a los productores de ovinos y caprinos de todo el mundo ya que tiene una gran difusión, con altas tasas de prevalencia. (Jánosi, 2009).

El agente etiológico de la epididimitis ovina ha sido asociado principalmente a *B. ovis* por ser el agente aislado con mayor frecuencia, su epidemiología y patogénesis está bien documentada (Biberstein, 1964; Brown et al, 1973; Walker, 1986); sin embargo, en el estudio de muestras animales infectados con epididimitis se sabe actualmente que *B. ovis* no es el único microorganismo capaz de producir la enfermedad, también puede ser causada por una variedad de bacilos pleomórficos gram negativos (BPGN) que se han clasificado en dos grupos: *Histophilus ovis* y *Actinobacillus spp.* (Burguess, 1982; Walker., 1986 Genetzky, 1995).

El estado clínico y el correcto funcionamiento del aparato reproductor en los machos es de gran trascendencia ya que los resultados, son de gran importancia económica, la brevedad de la temporada reproductiva impide que un macho pueda sanar y recuperar su fertilidad dentro de la misma temporada, y de ello dependerá que queden preñadas o no las hembras y por consiguiente aumentar o disminuir el número de cabezas en su ganado. (Robles, 1990, Lozano, 1986).

El signo clínico más frecuente de la epididimitis infecciosa es el aumento de tamaño, generalmente unilateral, del epidídimo, algunos animales infectados no presentan alteraciones detectables mediante palpación. (Méndez, 1999).

El aislamiento de los agentes etiológicos a partir de muestras adecuadas como son: semen, testículos y epidídimos, constituye el diagnóstico definitivo. (Méndez ,1999).

¹ *Haemophilus somnus*

Dentro del grupo *Histophilus ovis* hay BPGN que comparten características serológicas, bioquímicas y morfológicas, como el *Histophilus ovis* con *Haemophilus somnus*, actualmente *Histophilus somni* (Miller, 1983; Robles, 1998).

El diagnóstico de *Histophilus somni* en el laboratorio generalmente se basa únicamente en estudios bacteriológicos, pero la identificación de este microorganismo se dificulta debido a que se encuentran en la zona de infección un grupo de bacterias como parte de la flora normal del ovino, las cuales presentan morfología y propiedades bioquímicas similares. Por lo que se han desarrollado técnicas serológicas, bacteriológicas y de biología molecular para facilitar el diagnóstico, sin embargo estas pruebas presentan reacciones cruzadas con los microorganismos. (Pérez 2010).

1.1 Generalidades.

La epididimitis², es una inflamación del epidídimo que puede ser causada por infecciones bacterianas o por trauma, lo cual tiene repercusiones en la capacidad reproductora de los animales, (Palomares, 2005). Se han identificado como la causa común de infertilidad en carneros: en el grupo *Actinobacillus spp.*, se encuentran un grupo de bacilos causantes de lesiones en testículo y epidídimo que tienen propiedades diferentes que los caracteriza, y cuyos representantes son *A. seminis*, *A. actinomycetemcomitans*, otros microorganismos similares pertenecen al grupo *Actinobacillus* grupos A y B (*A. like*), todos estos son bacilos no esporulados, inmóviles, no ácido resistentes y no hemolíticos. (Baynes and Simons 1960; De Long, 1979; Neath, 1990), además de *B. ovis* (Oviedo, 1988), *H. somni* (Van Tonder, 1979; Nicolet, 1986; Baynes and Simmons, 1960).

Otros microorganismos relacionados con la etiología de la epididimitis son *Archaneabacterium pyogenes* (Egerton, 2000), *Bacteroides spp.* (Ekdahl., 1968), *Corynebacterium pyogenes* (Watt, 1966), *Manhemia haemolytica* (Fodor, 1984), *Moraxella spp.* (Fodor, 1984), *Pasteurella multocida* (Ekdahl, 1968), *Staphylococcus spp.* (Watt, 1970); *Streptococcus spp.* (Watt, 1970).

Esta enfermedad afecta en todo el mundo en un rango del 95% (Appuhamy, 1998). En México desde 1986, existen reportes de casos de epididimitis (Acosta, 2001). Entre los agentes causantes del contagio de la epididimitis e infertilidad en carneros se han citado diversos microorganismos (Cuadro 1). (De la Puente, 2000).

CUADRO 1

Agentes reportados en casos de Epididimitis ovina

(De la Puente, 2000)

<i>Actinobacillus seminis</i>
<i>Brucella ovis</i>
<i>Histophilus somni</i> ¹
<i>Manhemia haemolytica</i>
<i>Haemophilus agni</i>
<i>Histophilus ovis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>

² Epididimitis también se le conoce como orquiepididimitis. Se define como la infección del testículo, de sus envolturas serosas y del epidídimo, aguda o crónica, provoca engrosamiento y adherencias de las serosas parietal y vaginal, detectables clínicamente, lesión y obstrucción del epidídimo afectado, degeneración y atrofia del testículo del mismo lado y consiguiente subfertilidad ó esterilidad.

Esta variedad de bacterias son comensales del tracto respiratorio, digestivo y genital de los rumiantes, cerdos, equinos y roedores, son conocidos como patógenos oportunistas y en general solo causan enfermedades esporádicas. La infección se produce casi siempre a través de una herida en mucosas, estos microorganismos tienen la capacidad para penetrar en los tejidos debido a la presencia de enzimas proteolíticas que han sido parcialmente identificadas. Los agentes etiológicos de la epididimitis son habitantes normales de las mucosas de los carneros, y por causas no muy aclaradas pueden agredir y enfermar a estos animales de edades comprendidas entre la pubertad y los 18 meses, llegando hasta los 2 años la edad máxima de los afectados, siendo siempre animales que se han criado separados de carneros adultos u ovejas adultas. (Nicolet, 1986).

1.2 *Histophilus somni* y sus especies.

Algunos géneros importantes son *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*), *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus paragallinarum*. *Histophilus somni*¹ y *Taylorella* o *Haemophilus equigenitalis* (son especies de clasificación incierta en el género).

1.3 Características bacteriológicas de *H. somni*.

Es un cocobacilo corto, pleomórfico con tendencia a formar filamentos, no móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, gram negativo, catalasa negativo.

TABLA 1

Propiedades bioquímicas de microorganismos relacionados de campo y de referencia
(Stephens, 1983)

Organismo										
Especies	Cepa	Oxidativo (O) / Fermentativo (F)	Oxidasa	Catalasa	Indol	Nitratos	H ₂ S	Test ALA ^a	Crecimiento estimulado por TMP ^b	Satelitismo alrededor de <i>S. aureus</i>
<i>H. somnus</i>	43826	F	+	-	+	+	+	+	+	+
	26-16	F	+	-	+	+	+	+	+	-
	45468	F	+	-	+	+	+	+	+	+
	2426	F	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Histophilus ovis</i>	111	F	+	-	-	+	+	+	+	+
	43803	F	+	-	+	+	+	+	+	-
	H989	F	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>H. agni</i>	9L	F	+	-	-	+	+	+	+	+
	1344	F	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>A. seminis</i>		F	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. haemoglobinophilus</i>	ATCC	F	+	+	-	+	+	+	-	-
	ATCC	F	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>H. influenzae</i>	ATCC	F	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>A. lignieresii</i>	ATCC	F	+	-	-	+	+	+	-	-

^a Prueba del Ácido Delta- Aminolevulínico para síntesis de porfirina

^b Monofosfato de Tiamina TMP

TABLA 2

Características bioquímicas diferenciales principales de las especies más importantes del género *Haemophilus* (Nicolet, 1986)

	Factor X	Factor V	CO ₂	Indol	Ureasa	Hèmolisis	Glucosa	Manitol	KNO ₃
<i>H. parasuis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>H. pleuropneumoniae</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>H. paragallinarum</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>H. avium</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>H. haemoglobinophilus</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>H. somni</i>	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	+
<i>H. equigenitalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Identificado en 1956 como causante de neumonía, septicemia, meningoencefalitis trombótica (TME), otitis, miocarditis, artritis, poliartritis, conjuntivitis, mastitis y aborto en ganado vacuno, ovejas, ya que coloniza la superficie de las mucosas, también pueden existir portadores asintomáticos. (Palomares G, 2005).

1.4 Epidemiología.

H. somni se encuentra en las vías aéreas altas de animales sanos siendo la principal vía de contagio la aérea y por contacto directo (www.veterinaria.org/asociaciones/apuntesvet/microbiologia/Bacteriologia/4%20Fam.Pasteurellaceae).

Este patógeno puede ser inhalado, ingerido, o transmitido en forma venérea, identificándose una gran cantidad de animales portadores del microorganismo a nivel del tracto nasal y urogenital que constituye, no sólo el principal reservorio de infección, sino una importante vía de eliminación. (www.vet-uy.com/articulos/artic_bov/002/bov_002.htm - 124k).

La presencia patógena y no patógena de *H. somni* se encuentra dentro de la parte interna del prepucio de machos, la vagina de hembras. El organismo puede colonizar la zona respiratoria, probablemente después de la inhalación, y puede encontrarse con frecuencia en orina.

Los mecanismos a través de los cuales *H. somni* se difunde no están del todo aclarados, aunque se sospecha que muy probablemente la vía más común sea a través de aerosoles de animal a animal, debido a la alta frecuencia de infecciones respiratorias. (Zielinski, 2000).

La tasa de infección en ovinos sanos es alta, lo que evidencia dos posibilidades:

- 1) La existencia de cepas no patogénicas de *H. somni*, incapaces de producir enfermedad; o
- 2) La existencia de factores predisponentes para cepas potencialmente patogénicas que colonizan los distintos órganos en forma inaparente puedan producir enfermedad, ya sea en su forma nerviosa, respiratoria o reproductiva.

Probablemente las dos posibilidades sean ciertas. La mortalidad de bovinos por infecciones del Sistema Nerviosa Central en animales no medicados puede llegar al 100 %. (Zielinski, 2000).

1.5 Patogenia del género *Histophilus*.

Las diferentes especies de *Histophilus spp.* causan diversas enfermedades en animales como pueden ser:

- *H. parasuis*, Enfermedad de Glässer, en cerdos (poliserositis).
- *H. paragallinarum*, Coriza, contagiosa en las aves, se caracteriza por inflamación de los senos nasales, paranasales, ojos, mucosa nasal (rinitis, sinusitis, otitis, etc.) la inmunidad se logra por medio de vacunas inactivadas mixtas.
- *H. pleuropneumoniae*, neumonía, con alta mortalidad en ausencia de factores predisponentes en cerdos.
- *H. somni*, afecta de tres formas principalmente: Problemas de tipo neumónico acompañados de bacteremia en bovinos, localización a nivel de SNC dando origen a la meningoencefalitis tromboembólica y problemas articulares en bovinos, infecciones del tracto genital (aborto, reportado en ovinos).
- *Haemophilus equigenitalis*, endometritis y cervicitis en equinos transmisión venérea.

1.6 Factores de virulencia.

Los mecanismos de defensa del huésped que controlan la infección por *H. somni* no son claros. La principal proteína de membrana externa (OMP) de la bacteria tiene diferentes características distintivas las cuales pueden estar relacionadas a la virulencia o a la respuesta del huésped.

Las lesiones típicas exhiben una gran afluencia de neutrófilos, los cuales son incapaces de eliminar completamente al microorganismo.

H. somni opsonizado es ingerido, pero no muerto, por neutrófilos bovinos y fagocitos mononucleares in vitro. Se ha demostrado, que, *H. somni* o las fracciones del organismo, pueden inhibir la fagocitosis por monocitos bovinos, la fagocitosis, iodinación y la descarga de peróxido de hidrógeno por neutrófilos bovinos. (Yang, 1998).

No son bien conocidos los factores involucrados por los cuales algunas de las cepas de *H. somni* son más patógenas que otras. La invasión celular y la producción de septicemia son elementos requeridos para la producción de la enfermedad y los factores comunes de virulencia así como el pili y la cápsula, no han sido encontrados en *H. somni*, un lipooligosacárido (LOS) es considerado un importante factor de virulencia.

Los factores de virulencia son la cápsula para *H. somni*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus paragallinarum*, *A. pleuropneumoniae* y (LPS). Además de los siguientes, Cápsula: polisacáridos, Endotoxina: pared celular (lípidos A), Exotoxina, Enzimas: hialurodinasa y neuraminidasa. (Antognoli, M. 1996).

1.7 Sintomatología de la epididimitis.

La epididimitis puede tener una presentación clínica o subclínica. La epididimitis subclínica solo se puede diagnosticar demostrando la presencia del microorganismo en fluidos como cultivos de orina y/o semen.

La epididimitis clínica se puede presentar en forma aguda, con una intensa inflamación del escroto, el cual se encuentra aumentado de tamaño, tumefacto, caliente y doloroso; el borrego afectado está muy decaído, con elevación de temperatura rectal, anorexia, se resiste a caminar o lo hace con los miembros posteriores muy separados o con rengueras y envarado. Se diagnostica por cultivo de orina o semen, en la epididimitis subclínica no se presentan síntomas. (De Freitas, 1980).

Después de uno o dos días a la revisión clínica cuidadosa, se encuentran adherencias de las serosas muy evidentes, el epidídimo se palpa agrandado y firme, especialmente en la cola, y en pocas ocasiones se instala una fibrosis en la misma y pueden aparecer granulomas espermáticos y abscesos; lo anterior es causado por el grupo *Histophilus -Haemophilus* y no por *Actinobacillus seminis*.

Muchas veces el testículo adyacente se atrofia y degenera, y se encuentran fistulas que dejan salir una secreción purulenta ó se han secado y quedan cicatrices.

1.8 Diagnóstico y tratamiento de *H. somni*.

El diagnóstico se basa en: el aislamiento e identificación bacteriológica, considerando aspectos como el carácter microaerófilo de la bacteria, algunas especies requieren 5-10% de atmósfera de CO₂, morfología Gram, reacción (+) a Oxidasa, reacción (-) a Catalasa.

El diagnóstico bacteriológico, se realiza en medios específicos con sangre ovina al 5% para identificar los distintos serotipos, de los tres biovars existentes en el bovino. El medio de transporte al laboratorio es muy importante, se utiliza el medio de Amies (contiene: cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, fosfato monopotásico, fosfato disódico, tioglicolato disódico, agua destilada).
(<http://www.mbm.com.mx/copan/transporte.php>)

(www.vetuy.com/articulos/artic_bov/002/bov_002.htm - 124k).

El diagnóstico presuntivo en bovinos se basa en muestras y examinado de los tejidos finos afectados. La detección de muestras y las hemorragias retinianas indican enfermedad severa con daño irreversible substancial al SNC y a otros órganos. Las lesiones histológicas características consisten en vasculitis severa, trombosis vascular, el infarto, la necrosis, e infiltraciones pesadas de neutrófilos.

El aislamiento del organismo del cerebro o de otros órganos confirma el diagnóstico.

El aislamiento de *H. somni* del útero, de la placenta, o del contenido abomasal fetal es evidencia presunta para la enfermedad reproductiva debido a este organismo.

Para su cultivo se requieren factores de crecimiento: el factor X (protoporfirina IX o protohemina) y/o protoporfirina y el factor V (nicotinamin adenin dinucleótido o NAD). Los requerimientos del factor X y V pueden determinarse inoculando Agar Triptosa conteniendo

una estiría de *Staphylococcus aureus* como cepa nodriza (satelitismo). (www.pulso.com/medvet/Protegido/numero1-02/bacterias/bacterias.htm).

Para obtener una buena identificación de *Histophilus somni*, recientemente se ha utilizado la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con ella se prueban otros microorganismos como son: *Histophilus ovis* y *Haemophilus agni* (Angen et al., 1998; Tegmeier et al., 2000).

Entre las pruebas serológicas que se le realizan a *Histophilus somni* se encuentra la Inmunodifusión doble en Agar para el diagnóstico de anticuerpos específicos.

(www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias/articulo_sanidad.pdf).

Estudios de secuenciación de RNAr de la subunidad 16s y de los genes rpoB de algunas cepas que han sido estudiadas por hibridación ADN – ADN han proporcionado suficiente información para proponer una nueva clasificación de las 3 especies mencionadas. (Angen, 2003).

Dada la gran sensibilidad del microorganismo a la Penicilina y la Polimixina B, éstas dos son las sustancias antibacterianas de elección para el tratamiento.(Nicolet, 1986). El antibiótico de elección es la estreptomycinina en dosis altas durante tres días (Birmicina) o penicilina-gentamicina (Gentapen) ideal para el uso de vacas gestantes, las cuales se pretende que no aborten, y la combinación penicilina-estreptomycinina. En casos de endometritis por el complejo HS es ideal el uso de la combinación penicilina-gentamicina-estreptomycinina (5.000.000 UI, 500mg, 1g respectivamente) En los toros afectados el uso de la combinación penicilina con gentamicina (Gentapen), estreptomycinina con gentamicina, o espiromycinina con estreptomycinina es ideal. (www.vet-uy.com/articulos/artic_bov/002/bov_002.htm - 124k).

1.9 Las Citocinas.

La defensa frente a organismos extraños, como virus o bacterias, esta mediada por una inmunidad innata y una inmunidad específica (o adaptativa). Las fases efectoras de ambos

tipos de inmunidad están mediadas en gran medida por unas proteínas llamadas citocinas (también llamadas citoquinas). En la inmunidad innata, las citocinas efectoras son producidas principalmente por los fagocitos mononucleares, por ello se le llaman monoquinas. La mayoría de las citocinas de la inmunidad específica son producidas por linfocitos T activados, generalmente llamadas linfoquinas. Debido a que muchas de estas citocinas son producidas por ciertas poblaciones de leucocitos (células T, monocitos) y actúan sobre otras poblaciones de leucocitos (monocitos, neutrófilos o eosinófilos), a estas moléculas a veces se le llaman interleucinas (llamadas también interleuquinas). (Abbas, et al., 1999).

1.9.1 Propiedades Generales de las Citocinas.

Aunque las citocinas son un grupo diverso de proteínas, comparten una serie de propiedades: (Abbas, et al., 1999).

1. Las citocinas se producen durante las fases de activación y efectora de la inmunidad innata y específica, y sirven para mediar y regular la respuesta inflamatoria e inmunitaria.
2. La secreción de citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado. Una vez sintetizadas, por lo general se secretan rápidamente, lo que resulta en un pico de liberación en el momento en que son necesarias.
3. Muchas citocinas particulares son sintetizadas por múltiples tipos celulares distintos.
4. Las citocinas actúan sobre diferentes tipos celulares. A esta propiedad se le llama pleiotropismo.
5. Las citocinas a menudo presentan efectos diferentes sobre la misma célula diana.
6. Las acciones de las citocinas son con frecuencia redundantes.
7. Las citocinas a menudo influyen en la síntesis de otras citocinas, produciendo cascadas en las que pueden ser inducidas una segunda y una tercera citocina que pueden mediar los efectos biológicos de la primera.
8. Las citocinas generalmente influyen en la acción de otras, dos citocinas pueden interactuar para antagonizar mutuamente sus acciones y producir efectos de adición o,

en algunos casos, para producir efectos mayores de los esperados o incluso efectos únicos, un tipo de interacción denominada sinergia.

9. Las citocinas, como otras hormonas polipeptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de la célula diana, la principal puede ser la misma que secreta la citocina (acción autocrina), una célula cercana (acción paracrina) o, como otras hormonas verdaderas, una célula distante que es estimulada por las citocinas que han sido secretadas a la circulación (acción endocrina). Sólo se necesita producir pequeñas cantidades de una citocina para ocupar los receptores y producir un efecto biológico.
10. La expresión de muchos receptores de las citocinas está regulada por señales específicas.
11. La mayoría de las respuestas celulares a las citocinas requieren la síntesis de nuevo *ARNm* y proteínas.
12. Para muchas células diana, las citocinas actúan como regulando de la división celular, es decir, como factores de crecimiento.

Se ha organizado el estudio de las citocinas específicas en tres amplias categorías funcionales:

- 1) Mediadores y reguladores de la inmunidad innata, cuya producción por los macrófagos mononucleares es inducida por agentes infecciosos y estimulan o inhiben las reacciones inflamatorias.
- 2) Mediadores y reguladores de la inmunidad específica, que se producen como respuesta al reconocimiento por los linfocitos T de antígenos específicos y que sirven para intensificar, focalizar y especializar las reacciones inflamatorias.
- 3) Estimulando la proliferación y diferenciación de los leucocitos inmaduros, que son producidos tanto por los linfocitos activados como por otras células. (Abbas, et al., 1999, Janeway, 2003).

1.9.2 Citocinas que median y regulan la inmunidad innata.

La inmunidad innata empieza con una fase de reconocimiento de que algo extraño aparece en el huésped. Existen al menos cuatro mecanismos importantes para reconocer virus extraños y otros microorganismos durante la respuesta inmunitaria innata sin la participación de linfocitos T y B específicos de antígeno. (Rojas, 2001).

1. La presencia de virus puede ser reconocida por células infectadas por la presencia de ácidos nucleicos que no se asocian típicamente a la replicación celular o a la síntesis de proteínas de los mamíferos.
2. La presencia de virus también puede ser reconocida por las células citocidas naturales (NK).
3. Los lípidos bacterianos pueden ser reconocidos porque son estructuralmente distintos de los lípidos celulares de los mamíferos. Los fagocitos mononucleares expresan un receptor de superficie que puede reconocer muchos de estos lípidos extraños especialmente aquellos procedentes de la pared celular de bacterias gramnegativas, denominados como endotoxina o lipopolisacárido (LPS). Esto estimula al fagocito a sintetizar una serie de proteínas nuevas, entre ellas citocinas como TNF, Interleucina-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15. **(TABLA 3)**
4. Además del sistema de reconocimiento celular, los lípidos bacterianos también pueden ser reconocidos como extraños por ciertas proteínas plasmáticas circulantes.

Una consecuencia importante del reconocimiento de virus y bacterias es la secreción de citocinas. Los IFN tipo I, IL-2 e IL-15 secretados como respuesta a los virus sirven para reclutar y activar células NK, primera línea de defensa en la respuesta antiviral. Los TNF, IL-1 y quimiocinas secretadas en respuesta a las bacterias son los principales mediadores del reclutamiento de los fagocitos locales y, junto a la IL-6, producen respuestas sistémicas que favorecen la contención y eliminación de las bacterias. La IL-10 es importante regulador de la inmunidad innata. (Rojas, 2001).

TABLA 3
Mediadores Reguladores de la
Inmunidad Natural (Abbas, et al., 1999).

Citocina	Tamaño del polipéptido	Fuente celular	Célula diana	Efectos básicos en cada célula diana
IFN tipo I	18 kD	Fagocitos mononucleares, otros (α); fibroblastos, otros (β).	a) Todas b) Célula NK	a) Estado antiviral, expresión aumentada de MHC clase I. b) Activación.
Interleucina -15	13 kD	Fagocitos mononucleares, otros.	a) Células NK y Células T	a) Proliferación.
Interleucina-12	35 kD, 40 kD	Fagocitos mononucleares, células dendríticas.	a) Células NK y Células T	a) Síntesis de IFN- γ , función citocida, diferenciación de células T CD4 ⁺ .
Factor de necrosis Tumoral	17 kD	Fagocitos mononucleares, células T.	a) Neutrófilo b) Célula endotelial c) Hipotálamo d) Hígado e) Músculo, grasa	a) Activación (inflamación). b) Activación (inflamación, coagulación). c) Fiebre. d) Reactantes de fase aguda (amiloide sérico). e) Catabolismo (caquexia).
Interleucina-1	17 kD	Fagocitos mononucleares, otros.	a) Célula endotelial b) Hipotálamo c) Hígado d) Músculo e) Timocito	a) Activación (inflamación, coagulación). b) Fiebre. c) Reactantes de fase aguda (amiloide sérico). d) Catabolismo (caquexia). e) Coestimulación (in vitro).
Interleucina-6	26 kD	Fagocitos mononucleares, células endoteliales, célula T.	a) Célula B madura b) Hígado c) Timocito	a) Crecimiento. b) Reactantes de fase aguda (fibrinógeno). c) Coestimulación (in vitro).
Quimiocinas	8-10 kD	Fagocitos mononucleares, Células endoteliales; fibroblastos; células T; plaquetas.	a) Leucocitos	a) Quimiotaxis, quimioquinesis, adhesión, activación.
Interleucina-10	20 kD	Fagocitos mononucleares, células T	a) Fagocito mononuclear b) Célula B	a) Inhibición. b) Activación.

1.9.3 Interferones tipo I.

Los Interferones tipo I comprenden dos grupos de proteínas serológicamente distintos. El primer grupo, denominado IFN- α , es una familia de unos 20 polipéptidos, estructuralmente relacionados de aproximadamente 18 kD, cada uno de ellos codificados por un gen distinto, la principal fuente celular para la producción de IFN- α es el fagocito mononuclear, por lo que al IFN- α se le denomina interferón leucocitario. El segundo grupo serológico de IFN tipo I consta de un único producto génico, una glucoproteína de 20 kD llamada IFN- β , la fuente celular para el aislamiento del IFN- β es el cultivo de fibroblastos, por lo que al IFN- β se le llama a veces interferón fibroblástico. Tanto IFN- α como el IFN- β son secretados también durante la respuesta inmunitaria frente a los antígenos. (Zambrano, 1998, Bach, 1984).

Las cuatro acciones biológicas principales del IFN tipo I:

1. El IFN tipo I inhibe la replicación viral.
2. El IFN tipo I aumenta el potencial lítico de las células NK.
3. El IFN tipo I modula la expresión de las moléculas del MHC.
4. El IFN tipo I inhibe la proliferación celular.

1.9.4 Interleucina-12.

La interleucina-12 se identificó como un activador de la función citolítica de las células NK producido por los macrófagos, actualmente se sabe que es un potente inductor para la obtención de IFN- γ tanto por las células T, como por las células NK. La IL-12 activa es un heterodímero unido por enlaces disulfuro de subunidades de 35 kD (p35) y 40 (p40). La subunidad p35 contiene motivos que se pliegan probablemente en un dominio globular de cuatro hélices α característico de las citocinas que se unen a los receptores de citocinas tipo I. La subunidad p40, al igual que el receptor de IL-6, presenta un dominio tipo Ig y dos motivos cisteína. Parece que hay muchas células que sintetizan p35, pero la síntesis de p40 está restringida a los fagocitos mononucleares activados y a las células dendríticas. Estos tipos

celulares son las fuentes principales de IL-12 biológicamente activa. (Abbas, et al., 1999, Janeway, 2003).

Se han reconocido varias acciones biológicas de la IL-12 sobre las poblaciones NK y T:

1. La Interleucina-12 hace que las células NK y las células T secreten IFN- γ .
2. La IL-12 actúa como un factor de diferenciación para las células T CD4⁺, favoreciendo su especialización en células tipo T_H1 productoras de IFN- γ que ayudan en la inmunidad mediada por los fagocitos.
3. La Interleucina-12 aumenta la función citolítica de las células NK activadas y las células T CD8+. La IL-12 no actúa sobre poblaciones celulares en reposo y parece que funciona con una señal diferenciadora.

1.9.5 Interleucina-15.

La IL-15 es una citocina polipeptídica de 17 kD liberada por los fagocitos mononucleares y ciertas células tisulares como respuesta a una infección viral, LPS u otras señales que desencadenan la inmunidad innata. Estructuralmente, la Interleucina-15 es homóloga a la IL-12 y transduce señales a través del complejo receptor de baja afinidad utilizado por la IL-2. La función primaria de la IL-15 es favorecer la proliferación de las células NK, puede actuar también como un factor de crecimiento para las células T. (Margni, 1996).

1.9.6 Factor de necrosis tumoral.

Es el mediador principal de la respuesta frente a las bacterias gramnegativas y también puede desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias innatas frente a otros organismos infecciosos. El TNF fue identificado inicialmente como un mediador de la necrosis tumoral. (Rojas, 2001).

La principal fuente celular del TNF son los fagocitos mononucleares activados por el LPS, aunque también puede ser secretado por células T estimuladas por antígeno, células NK y

mastocitos activados. El IFN- γ . producido por las células T, aumenta la síntesis de TNF por los fagocitos mononucleares estimulados por el LPS. El TNF actúa como mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, y es un importante nexo de unión entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda. (Janeway, 2003).

En el fagocito mononuclear, el TNF es sintetizado inicialmente como una glucoproteína transmembrana no glucosilada de aproximadamente 25 kD. (Margni, 1996).

Las acciones biológicas del TNF, al igual que las del LPS, se entienden mejor como una función cuantitativa. Cuando se producen cantidades pequeñas, el TNF actúa localmente como un regulador paracrino y autocrino de los leucocitos y las células endoteliales. Las principales acciones biológicas del TNF a concentraciones bajas son las siguientes: (Abbas, et al., 1999).

1. El TNF hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie (moléculas de adhesión) que hacen que los leucocitos se adhieran a la superficie de la célula endotelial, inicialmente los neutrófilos y, posteriormente, los monocitos y linfocitos. El TNF actúa igualmente sobre los neutrófilos aumentando su adhesividad a las células endoteliales. Estas acciones contribuyen a la acumulación de leucocitos en los focos inflamatorios y son probablemente los efectos locales fisiológicamente más importantes del TNF.
2. El TNF estimula a los fagocitos mononucleares y otros tipos celulares a la secreción de quimiocinas que contribuyen al reclutamiento de leucocitos.
3. El TNF activa los leucocitos inflamatorios para que destruyan microorganismos. El TNF es especialmente potente para activar los neutrófilos, pero también afecta a eosinófilos y fagocitos mononucleares.
4. La producción crónica de concentraciones bajas de TNF da lugar a la remodelación tisular. Actúa como un factor de angiogénesis, induciendo la formación de nuevos vasos, así como un factor de crecimiento para los fibroblastos, induciendo el depósito de tejido conectivo. Si persiste la producción de TNF, estos tejidos pueden adquirir la apariencia de tejido linfoide ectópico, con acumulaciones de grupos organizados de células B y T.

Si el estímulo para la producción del TNF es suficientemente intenso, se producen grandes cantidades de la citocina. En esta situación, el TNF entra en el torrente sanguíneo, donde puede actuar como una hormona endocrina. Las principales acciones sistémicas del TNF en las respuestas fisiológicas del huésped frente a infecciones son las siguientes: (Abbas, et al., 1999, Janeway, 2003).

1. El TNF es un pirógeno endógeno que actúa sobre las células de las regiones reguladoras del hipotálamo en el cerebro para inducir fiebre. Comparte esta propiedad con la IL-1, y ambas citocinas se encuentran en el suero de animales o personas expuestas a LPS, el cual actúa como un pirógeno exógeno. La producción de fiebre como respuesta TNF o a la IL-1 está mediada por el aumento de la síntesis de prostaglandinas por las células del hipotálamo estimuladas por las citocinas.
2. El TNF actúa sobre los fagocitos mononucleares y quizás sobre las células endoteliales vasculares para estimular la secreción de IL-1 e IL-6 a la circulación.
3. El TNF actúa sobre los hepatocitos aumentando la síntesis de ciertas proteínas séricas, como la proteína A del amiloide sérico. La combinación de las proteínas plasmáticas derivadas de los hepatocitos inducidas por el TNF o la IL-1, junto con aquellas producidas por la IL-6, constituyen la respuesta de fase aguda a estímulos inflamatorios.
4. El TNF activa el sistema de coagulación principalmente por alteración del equilibrio de las actividades procoagulante y anticoagulante del endotelio vascular.
5. El TNF suprime la división de las células madre en la médula ósea.
6. La administración sistémica continuada de TNF a animales de experimentación produce las alteraciones metabólicas de la caquexia, estado caracterizado por la pérdida de células musculares y adiposas.

En los casos de sepsis por bacterias gramnegativas se producen cantidades masivas de TNF, y las concentraciones séricas pueden sobrepasar transitoriamente los 10^{-7} M. Los animales que producen tales cantidades de TNF mueren por colapso circulatorio y coagulación intravascular diseminada. La infusión de dosis elevadas de TNF es por sí misma letal, produciendo un

síndrome similar al shock. Varias acciones específicas del TNF pueden contribuir a sus efectos letales a concentraciones extremadamente elevadas. (Roitt, 2000).

1. El TNF reduce la perfusión tisular por depresión de la contractibilidad miocárdica.
2. El TNF disminuye aún más la presión sanguínea y la perfusión tisular mediante la relajación del tono del músculo liso vascular.
3. El TNF produce trombosis intravascular, lo que lleva a una disminución de la perfusión tisular.
4. El TNF produce alteraciones metabólicas graves, como la reducción de la concentración de glucosa.

1.9.7 Interleucina-1.

La Interleucina-1 se definió inicialmente como un polipéptido derivado de los fagocitos mononucleares que aumentaba la respuesta de los timocitos a los activadores policlonales, es decir, como un co-estimulador de la activación de las células T. Actualmente está claro que la principal función de la IL-1, al igual que la del TNF, es mediar la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata. (Abbas, et al., 1999).

La principal fuente celular de IL-1, al igual que de TNF es el fagocito mononuclear activado, puede desencadenarse por productos bacterianos como el LPS, por citocinas derivadas de macrófagos como el TNF o la misma IL-1 y por el contacto con células T CD4⁺. La IL-1 puede encontrarse en la circulación tras la sepsis por bacterias gramnegativas, donde puede actuar como una hormona endocrina. En este caso, es producida como respuesta al TNF. (Margni, 1996).

Hay dos formas principales de IL-1, llamadas IL-1 α e IL-1 β , productos de dos genes diferentes. Ambas formas son polipéptidos de 17 kD. Hay un tercer miembro de la familia llamado antagonista del receptor de IL-1. Un cuarto miembro de la familia, a veces llamado IL-1 γ , comparte con la IL-12 la capacidad de inducir la secreción del IFN- γ por las células NK. (Zambrano, 1998).

Los efectos biológicos de la IL-1, de forma similar a los del TNF, dependen de la cantidad de citocina liberada. A concentraciones bajas la principal función es ser mediador de la inflamación local. (Roitt, 2000).

Cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 entra en la circulación y ejerce efectos endocrinos. La IL-1 sistémica comparte con el TNF la capacidad de producir fiebre, inducir la síntesis hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda (amiloide sérico A) e iniciar el desgaste metabólico (caquexia). (Rojas, 2001).

1. La IL-1 no produce daño tisular por sí misma, aunque se secrete en respuesta al LPS y pueda potenciar el daño tisular causado por el TNF. A concentraciones sistémicas elevadas la IL-1 no es letal.
2. Aunque la IL-1 mimetiza muchas de las propiedades inflamatorias y procoagulantes del TNF, la IL-1 no puede sustituir al TNF como mediador en la reacción de Shwartzman y no produce necrosis hemorrágica de tumores.
3. La IL-1 no induce la muerte celular por apoptosis de tumores u otras células.
4. La IL-1 no comparte con el TNF la capacidad de aumentar la expresión de las moléculas del MHC.
5. La IL-1 potencia, en vez de suprimir, las acciones de los CFS sobre las células de la médula ósea.

1.9.8 Interleucina-6.

La Interleucina-6 es una citocina de aproximadamente 26 kD que es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos y otras células en respuesta a la IL-1 y, en menor medida, al TNF. También la sintetizan algunas células T activadas. Se puede detectar IL-6 en la circulación tras infecciones por bacterias gramnegativas o tras la infusión de TNF, y parece ser secretada como respuesta al TNF o a la IL-1 más que por estímulo directo del LPS. La IL-6 no produce trombosis vascular ni el daño tisular observado por la acción del TNF o el LPS. (Abbas, et al., 1999).

Las dos acciones mejor descritas de la IL-6 se dan sobre los hepatocitos y las células B: (Janeway, 2003).

1. La Interleucina-6 estimula a los hepatocitos a sintetizar varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuyen a la respuesta de fase aguda.
2. La IL-6 sirve como factor de crecimiento de células B activadas en las fases finales de la secuencia de diferenciación de las células B.
3. También la Interleucina-6 actúa junto a otras citocinas como cofactor de crecimiento de las células madre hemopoyéticas en la médula ósea.

1.9.9 Quimiocinas.

Constituyen una gran familia de citocinas estructuralmente homólogas, con un tamaño aproximado de 8 a 10 kD, que comparten la capacidad de estimular la motilidad de los leucocitos (quimioquinesis) y su movimiento dirigido (quimiotaxis). Quimiocinas proviene de la contracción de citocinas quimiotácticas. Todas estas moléculas contienen dos enlaces disulfuro internos. (Rojas, 2001).

Se dividen en dos subfamilias según tengan los dos residuos de cisteína del extremo aminoterminal que participan en el enlace disulfuro inmediatamente adyacente (C-C) o separados por un aminoácido (C-X-C). (Roitt, 2000).

1.9.10 Interleucina-10.

La Interleucina-10 es una citocina de 18 kD producida por macrófagos activados, algunos linfocitos y algunos otros tipos celulares no linfocíticos (ejemplo: queratinocitos). La IL-10 es miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices α y probablemente actúa como un homodímero. Las dos actividades principales de la IL-10 son inhibir la producción de citocinas (TNF, IL-1, Quimiocina e IL-2) por los macrófagos y las funciones accesorias de éstos en la activación de las células T. (Janeway, 2003).

1.9.11 Citocinas que median y regulan la inmunidad específica.

Una característica de la fase de activación de la respuesta inmunitaria específica es la transcripción y secreción de citocinas por las células T. Estas citocinas actúan como reguladores y como mediadores de la fase efectora de la respuesta. Algunas de estas citocinas, como: IL-2, IL-4 y TGF- β , actúan de forma autocrina regulando la respuesta de las mismas células T que sintetizan estas moléculas. Actúan también de forma paracrina en las células T, células B y otros tipos de células vecinas. Otras citocinas como IFN- γ , linfotóxina (LT), IL-5 e IL-3, actúan sobre células como macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Las células T activadas pueden especializarse en la producción de subtipos particulares de citocinas que favorecen determinados tipos de respuestas celulares efectoras. (Abbas, et al., 1999). **(TABLA 4)**

1.9.12 Interleucina-2.

Inicialmente fue llamada factor de crecimiento de células T (TCGF, del inglés T cell growth factor), es la principal citocina responsable de la progresión de los linfocitos T desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La IL-2 es producida por las células T CD4+ y, en menor cuantía, por las células T CD8+. La IL-2 actúa sobre las mismas células que la producen, es decir, actúa como un factor de crecimiento paracrino. Durante la respuesta inmunitaria fisiológica, la IL-2 no circula en la sangre para actuar a distancia, por lo que no se considera un factor de crecimiento endocrino. (Abbas, et al., 1999). **(TABLA 4)**.

La IL-2 secretada es una glucoproteína de entre 14 y 17 kD. La IL-2 natural está plegada formando una proteína globular que consta de un par emparejado de hélices α . Normalmente, la IL-2 es transcrita, sintetizada y secretada por las células T sólo tras la activación por antígenos. La síntesis de IL-2 suele ser transitoria con un pico inicial de secreción, alrededor de 4 horas tras su activación. (Rojas, 2001).

Las principales acciones de la IL-2 se producen sobre los linfocitos: (Margni, 1996).

1. La IL-2 es el principal factor de crecimiento autocrino para los linfocitos T, y la cantidad de IL-2 sintetizada por las células T CD4⁺ activadas es un determinante importante de la intensidad de las respuestas inmunitarias mediadas por células T. También estimula la síntesis de otras citocinas producidas por las células T, como el IFN- γ y la linfoxina.
2. La IL-2 estimula la proliferación de las células NK y potencia su función citolítica, produciendo las llamadas células citocidas activadas por linfoquinas (LAK). Sólo concentraciones elevadas de IL-2 dan lugar a la formación de células LAK.
3. La Interleucina-2 actúa como factor de crecimiento de las células B del ser humano y como estímulo de la síntesis de anticuerpos. No parece producir cambios de isotipos.
4. La IL-2 puede actuar como factor de muerte para las células T activadas por el antígeno, favoreciendo la apoptosis.

TABLA 4
Mediadores y Reguladores de la
Inmunidad Específica (Abbas, et al., 1999).

Citocina	Tamaño del polipéptido	Fuente celular	Célula diana	Efectos básicos en cada célula diana
Interleucina-2	14-17 kD	Células T	a) Células T b) Células NK c) Células B	a) Proliferación; producción de citocinas. b) Proliferación, activación. c) Proliferación, síntesis de anticuerpos.
Interleucina-4	20 kD	Células T CD4 ⁺ mastocitos	a) Células B b) Células T c) Célula endotelial	a) "Switching" de isotipo a IgE b) Proliferación, diferenciación. c) Activación.
Factor Transformador de crecimiento	14 kD	Células T, fagocitos mononucleares, otras	a) Células T b) Otras	a) Inhibición. b) Proliferación.
Interferón- γ	21-24 kD	Células T, células NK	a) Fagocito mononuclear b) Célula endotelial c) Todas	a) Activación. b) Activación. c) Aumento de Moléculas de clase I y II del CMH.
Linfotoxina	24 kD	Células T	a) Neutrófilo b) Célula	a) Activación. b) Activación.

			endotelial	
Interleucina-5	20 kD	Células T	a) Eosinófilo	a) Activación, producción.
Ligando de c-kit	24 kD	Células del estroma de la médula ósea	a) Célula madre pluripotencial	a) Activación
Interleucina-7	25 kD	Fibroblastos, células del estroma de la médula ósea	b) Progenitor inmaduro	a) Proliferación y diferenciación hacia todas las líneas celulares
Interleucina-3	20-26 kD	Células T	a) Progenitor inmaduro	a) Proliferación y diferenciación hacia todas las líneas celulares
Granulocitos-Monocitos-CSF	22 kD	Células T, fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos	a) Progenitor inmaduro b) Progenitor comprometido c) Fagocito mononuclear	a) Proliferación y diferenciación hacia todas las líneas celulares b) Diferenciación a granulocitos y fagocitos mononucleares c) Activación
Monocito-CSF	40 kD	Fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos	a) Progenitor comprometido	a) Diferenciación a fagocitos mononucleares
Granulocito-CSF	19 kD	Fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos	a) Progenitor comprometido	a) Diferenciación a granulocitos

kD kilodalton; NK, citocida natural; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; CSF, factor estimulador de colonias

1.9.13 Interleucina-4.

La Interleucina-4 fue identificada inicialmente como una citocina producida por las células T cooperadoras, de aproximadamente 20 kD, que estimulaba la proliferación de las células B del ratón en presencia de anticuerpos anti-Ig (un análogo del antígeno) y provocaba el crecimiento de las células B en reposo, así como la expresión aumentada de las moléculas MHC de clase II. La función fisiológica principal de la IL-4 es regular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y mastocitos/eosinófilos. La IL-4 es miembro de la familia de las citocinas con cuatro hélices α , y su receptor es una proteína de 130 kD. Las principales fuentes celulares de IL-4 son los linfocitos T $CD4^+$, específicamente de la subpoblación T_H2 . La producción de IL-4 se utiliza como criterio para clasificar a las células T $CD4^+$ en esta subpoblación, siendo el $IFN-\gamma$

el distintivo de las células T_H1. Los mastocitos y basófilos activados, al igual que algunas células T CD8⁺, son capaces igualmente de producir IL-4. (Roitt, 2000).

La IL-4 tiene importantes acciones sobre varios tipos celulares: (Abbas, et al., 1999).

1. Se requiere IL-4 para la producción de IgE y es la principal citocina que estimula el cambio de las células B a este isotipo de cadena pesada.
2. La IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación para las células T, en particular para las células de la subpoblación T_H2. La IL-4 favorece el desarrollo de las células T_H2 a partir de las células T vírgenes estimuladas por el antígeno, y también funciona como un factor de crecimiento autocrino para las células T_H2 diferenciadas, favoreciendo posteriormente la expansión de esta subpoblación.
3. La IL-4 estimula la expresión de ciertas moléculas de adhesión, especialmente la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1, del inglés, vascular cell adhesion molecule-1) de las células endoteliales, lo que aumenta la unión de linfocitos, monocitos y, especialmente, eosinófilos. Las células endoteliales tratadas con IL-4 también secretan quimiocinas de la familia C-C como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, del inglés, monocyte chemoattractant protein-1). Como resultado de ello, las concentraciones locales elevadas de IL-4 inducen reacciones inflamatorias ricas en monocitos y eosinófilos.
4. La IL-4 es un factor de crecimiento para los mastocitos y actúa sinérgicamente con la interleucina-3 en la estimulación de la proliferación de los mastocitos.

1.9.14 Factor transformador de crecimiento- β .

La descripción inicial del factor transformador de crecimiento- β se hizo en el campo de la biología tumoral. Se observó que ciertos tumores producían actividades, llamadas factor transformador de crecimiento (TGF, del inglés, transforming growth factor) que permitiría a los tipos celulares normales proliferar. Esta estimulación del crecimiento era causada por un polipéptido llamado TGF- α pero que la supervivencia requería un segundo factor, llamado

TGF- β . El TGF- α es un factor de crecimiento polipeptídico para las células epiteliales y mesenquimatosas. (Abbas, et al., 1999, Margni, 1996).

El TGF- β es una familia de moléculas estrechamente relacionada, habitualmente se les designa como: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Las células del sistema inmunitario (células T y monocitos) sintetizan principalmente TGF- β 1, pero ciertas localizaciones anatómicas (dentro del sistema nervioso central o en el interior de la cámara anterior del ojo) pueden contener niveles altos de TGF- β 3, éste actúa suprimiendo la inmunidad local. El TGF- β 1 nativo es una proteína homodimérica de aproximadamente unos 28 kD, se sintetiza en una forma latente que debe ser activada por proteasas extracelulares. Tanto las células T activadas por el antígeno como los fagocitos mononucleares activados por el LPS secretan un TGF- β 1 biológicamente activo. (Rojas, 2001).

Las acciones del TGF- β son altamente pleiotrópicas, inhibe el crecimiento de muchos tipos celulares y estimula el de otros. Provoca la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, por ejemplo: colágeno, de enzimas modificadoras de la matriz, metaloproteinasas de la matriz y de receptores celulares para las proteínas de la matriz como son las integrinas. In vivo, el TGF- β produce la proliferación de nuevos vasos sanguíneos, proceso llamado angiogénesis. (Roitt, 2000).

Como citocina, el TGF- β es potencialmente importante porque antagoniza muchas respuestas de los linfocitos. Inhibe la proliferación de células T frente a mitógenos policlonales o en reacciones mixtas de leucocitos, inhibe la maduración de los CTL y la activación de los macrófagos. También actúa sobre leucocitos polimorfonucleares y las células endoteliales, contrarrestando de nuevo los efectos de las citocinas proinflamatorias. En este sentido el TGF- β es una anti-citocina y puede actuar como señal de interrupción de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. (Janeway, 2003).

1.9.15 Interferón- γ .

El IFN- γ , también es llamado interferón tipo II o inmunitario, es una glucoproteína homodimérica que contiene dos subunidades de entre 21 y 24 kD. Es producido por las células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas y por las células NK. El inicio de la transcripción es consecuencia de la activación por el antígeno y aumenta por la acción de la IL-2 y la IL-12. El IFN- γ producido por las células citocidas naturales (NK) puede actuar como mediador de la inmunidad innata y contribuir al shock séptico. (Margni, 1996).

El IFN- γ tiene varias propiedades relacionadas con la inmunorregulación que lo separan funcionalmente del IFN tipo I:

1. El IFN- γ es un potente activador de los fagocitos mononucleares. Induce directamente la síntesis de enzimas que median el estallido respiratorio, permitiendo que los macrófagos humanos destruyan a los microorganismos fagocitados. En los macrófagos murinos el IFN- γ actúa coordinadamente con el TNF o LT induciendo la isoforma de alta producción de la sintasa de óxido nítrico, lo que permite la producción copiosa de radicales NO que tiene efectos similares a los radicales reactivos de oxígeno sintetizados por los macrófagos humanos. Las citocinas que provocan estos cambios funcionales en los fagocitos mononucleares se han denominado factores activadores de macrófagos (MAF, del inglés, macrophage-activating factors). El IFN- γ es el principal MAF y proporciona el mecanismo a través del cual las células T activan a los macrófagos. Otros MAF son el GM-CSF y, en menor proporción: IL-1, TNF y LT. El IFN- γ activa completamente a los macrófagos para destruir a los microorganismos fagocitados, pero sólo los activa parcialmente para eliminar tumores.
2. El IFN- γ aumenta la expresión de moleculares MHC de clase I y, a diferencia del IFN tipo I, también provoca la expresión de moléculas MHC de clase II en una gran variedad de tipos celulares. Así, el IFN- γ amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria favoreciendo la activación de las células T CD4⁺ cooperadoras restringidas

por la clase II. In vivo, el puede aumentar la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral a través de estas acciones durante la fase de reconocimiento (**FIGURA 1**).

3. El IFN- γ actúa sobre los linfocitos T favoreciendo su diferenciación. Favorece la diferenciación de las células T CD4⁺ vírgenes en la subpoblación T_H1 e inhibe la proliferación de las células T_H2 en ratones. Es posible que estos efectos estén mediados por la activación de los fagocitos mononucleares para secretar IL-12 y de las células T para expresar receptores funcionales de IL-12. El IFN- γ es también una de las citocinas requeridas para la maduración de los CTL CD8⁺.
4. En ratones, el IFN- γ actúa sobre las células B. Induce respuestas de anticuerpos que también participan en la eliminación de microorganismos mediada por fagocitos.
5. El IFN- γ activa los neutrófilos aumentando su metabolismo oxidativo. Es un activador de neutrófilos menor potente que el TNF o LT.
6. El IFN- γ estimula la actividad citolítica de las células NK, más que el IFN tipo I.
7. El IFN- γ es un activador de las células endoteliales vasculares, favoreciendo la adhesión de los linfocitos T CD4⁺ y las alteraciones morfológicas que facilitan la extravasación de éstos. También potencia muchas de las acciones del TNF sobre las células endoteliales (Abbas, et al., 1999).

El efecto neto de esta variedad de actividades del IFN- γ es favorecer reacciones inflamatorias ricas en macrófagos, mientras que inhiben reacciones ricas en eosinófilos dependientes de IgE. (Zambrano, 1998).

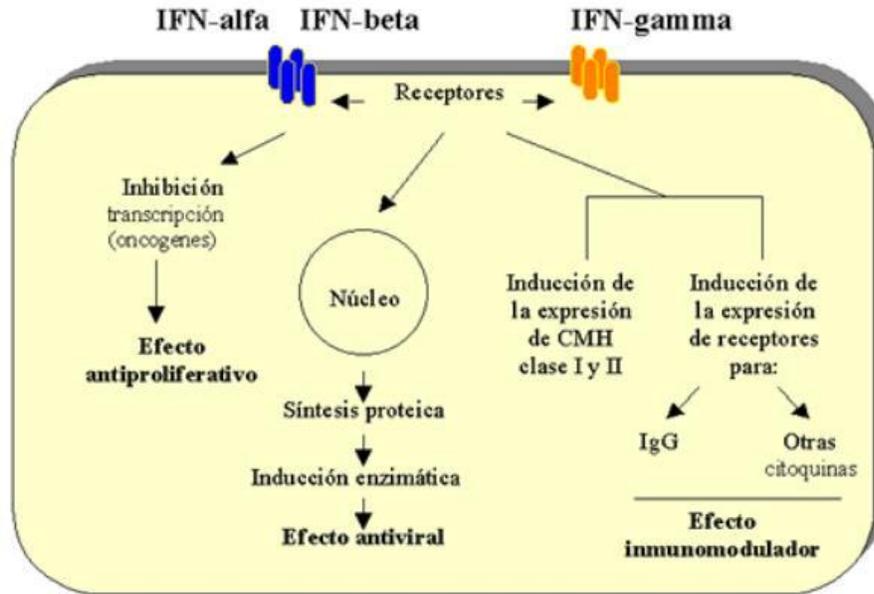


Figura 1: Receptores y mecanismo de acción de los Interferones (IFN).

1.9.16 Linfotoxina.

La linfotoxina (LT) es una glucoproteína de 21 a 24 kD que es homóloga al TNF en aproximadamente un 30% y compete con éste por la unión a los mismos receptores de superficie celular. La LT se denomina a veces TNF- β . La LT es producida exclusivamente por los linfocitos T activados y a menudo es producida coordinadamente con el IFN- γ por tales células. La LT se secreta como una verdadera proteína secretoria sin región transmembrana. (Abbas, et al., 1999, Rojas, 2001).

No se han encontrado grandes diferencias entre los efectos biológicos del TNF soluble y la LT, en consonancia de que se unen a los mismos receptores. Las principales diferencias entre estas citocinas son: (Roitt, 2000).

- 1) Que la LT es sintetizada exclusivamente por las células T, procede principalmente de los fagocitos mononucleares.
- 2) Que la LT, y no el TNF, puede expresarse como parte de un complejo heterotrímico con una proteína de membrana tipo II llamada LT- β .

Las cantidades de LT sintetizadas por las células T son mucho menores que las de TNF producidas por los fagocitos mononucleares estimulados por el LPS, y la LT no se detecta fácilmente en la circulación. La LT actúa habitualmente como un factor paracrino local y no como un mediador de lesión sistémica. Aun que ni el TNF ni la LT son tóxicos para las células normales (noneoplásicas, ambas citocinas pueden inducir la apoptosis de algunas células tumorales). La LT es un potente activador de neutrófilos y, de esta forma, proporciona a los linfocitos un medio para regular las reacciones inflamatorias agudas. Es más potente que el IFN- γ en la activación de neutrófilos, y las acciones de la LT están potenciadas por el IFN- γ . La LT es también activadora de las células endoteliales vasculares, produciendo aumento de la adhesión de leucocitos, producción de citocinas y cambios morfológicos que facilitan la extravasación de los leucocitos. Estos efectos, como los del TNF, están potenciados por el IFN- γ . (Abbas, et al., 1999, Margni, 1996).

1.9.17 Interleucina-5.

La interleucina-5 (IL-5) es una citocina de aproximadamente 20 kD que funciona como un homodímero. Es producida por la subpoblación T_H2 de las células T $CD4^+$ y por los mastocitos activados. Pertenece a la familia de citocinas con cuatro hélices α y cada haz de cuatro hélices consta de tres hebras de un monómero y una hebra del otro. (Rojas, 2001).

La acción principal de la IL-5 es estimular el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos y activar los eosinófilos maduros de manera que puedan matar helmintos. Esta función de la IL-5 se complementa con las funciones de la IL-4 (por ejemplo: cambio a IgE y reclutamiento de eosinófilos), contribuyendo a las reacciones alérgicas y a las respuestas contra helmintos y artrópodos mediadas por T_H2 . La IL-5 puede actuar sinérgicamente con otras citocinas, como IL-2 e IL-4, para estimular el crecimiento y diferenciación de las células B. También actúa sobre células B más maduras produciendo un aumento de la síntesis de inmunoglobulinas, especialmente IgA. (Abbas, et al., 1999, Janeway, 2003).

1.9.18 Otras citocinas de la inmunidad específica.

La interleucina-13 es una citocina de 15 kD con cuatro hélices α producida por las células T $CD4^+$ T_H2 y quizás por otros tipos celulares. El receptor para esta citocina es un heterodímero compuesto por una proteína con un único dominio de dos cisternas que se une a la IL-13 y al receptor de IL-4. Este receptor heterotrímico, que puede ser activado tanto por la IL-13 como la IL-4, se distribuye ampliamente en células no linfoides, especialmente macrófagos y células endoteliales vasculares. Las acciones de la IL-13 sobre las células endoteliales, que incluyen la inducción de la molécula de adhesión celular vascular-1 y la producción de quimiocinas C-C, pueden contribuir al reclutamiento de eosinófilos hacia los tejidos durante las reacciones inmunitarias mediadas por T_H2 . (Rojas, 2001, Abbas, et al., 1999).

La interleucina-16 es una citocina de 40 kD producida por las células T que actúa como sustancia quimiotáctica específica para eosinófilos. Parece proceder de un fragmente de una proteína intracelular y no se sabe si es secretada en condiciones fisiológicas. (Abbas, et al., 1999).

La interleucina-17 es una citocina de 20 kD producida por las células T que mimetiza muchas de las acciones pro-inflamatorias del TNF y LT. Se desconoce su acción in vivo. (Janeway, 2003).

El factor inhibidor de la migración es una sustancia producida por las células T que inmoviliza a los fagocitos mononucleares, efecto que podría hacer que éstos queden retenidos en focos inflamatorios. (Zambrano, 1998).

Las citocinas de interés en el presente trabajo son las siguientes:

IL-2: Promueve la proliferación de células T ($LTh0 \rightarrow LTh1$; inmunidad celular). Ejerce su acción a través de un receptor de membrana formado por 3 subunidades (a, b y g). Tras su acción se libera y solubiliza la fracción a (p55), como sIL-2R, que compite con el receptor por la IL-2, disminuyendo su biodisponibilidad. Las principales células productoras son, entre

otras, los Linfocitos LTh0 activados y los LTh1. (www.a14.san.gva.es/laboratorio/Web/Citocinas.htm). (FIGURA 2)

IL-4: Promueve la proliferación de células T (LTh0 → LTh2; inmunidad humoral) y la activación, proliferación y diferenciación de los Linfocitos B. Al igual que la IL-2, al unirse a su receptor se solubiliza una cadena α de éste, como sIL-4R, la cual disminuye su biodisponibilidad. Las principales células productoras son, entre otras, los Linfocitos Th0 activados y los mastocitos.(www.a14.san.gva.es/laboratorio/Web/Citocinas.htm).

Los Interferones son una familia de proteínas en la que se reconocen tres tipos: α , producido por leucocitos; β , por fibroblastos, y γ , por linfocitos T. Los dos primeros son inducidos por la infección viral mientras que el último, también denominado interferón inmune, es liberado a consecuencia de la interacción linfocito T-Ag por lo que se le clasifica dentro de las interleucinas o citocinas.(Montaraz,1997). (FIGURA 2)

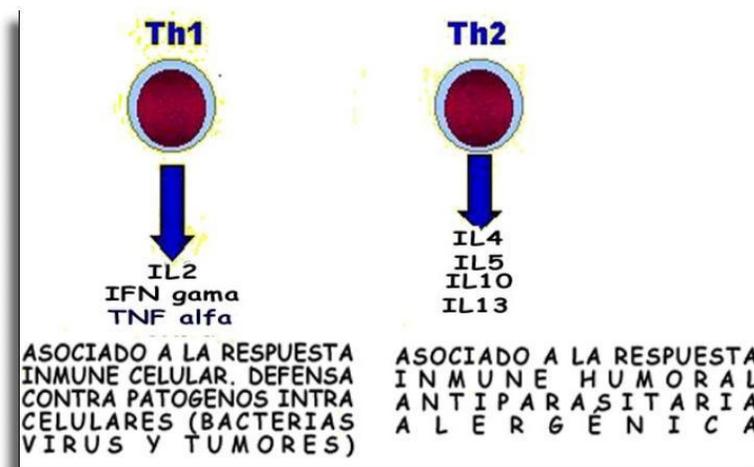


Figura 2: Efectos biológicos de la respuesta Th 1 y Th 2

(<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimicaanterior/citoquinas.htm>)

IFN- γ : Actúa sobre un receptor distinto a los anteriores, por lo que también se le denomina IFN tipo II. Interviene en la activación de Macrófagos, células NK, LT8 y LAK, induce la expresión celular del CMH tipo I y II e intensifica la secreción de mediadores de inflamación en muchos tipos celulares. Además, incrementa la expresión de la subunidad α del receptor para la IL-2 y actúa sinérgicamente con el TNF- α como anti-tumoral. Las principales células productoras son, entre otras, los Linfocitos T activados y células NK. (www.a14.san.gva.es/laboratorio/Web/Citocinas.htm). **(FIGURA 2)**

El IFN- γ es probablemente el de mayor relevancia biológica. Esta proteína es producida y liberada a consecuencia de la infección viral e impide, de manera inespecífica, la replicación viral en células vecinas (Figura 2). Se logra a través de la activación de una serie de enzimas celulares que interfieren con RNA mensajeros de origen viral o con la síntesis de péptidos virales. (Montaraz, 1997). **(FIGURA 2)**

II. JUSTIFICACIÓN.

Histophilus somni es uno de los microorganismos involucrado en la epididimitis contagiosa del borrego (carnero, oveja, cordero), enfermedad de gran trascendencia que ocasiona problemas económicos a los productores de ovinos y caprinos de todo el mundo. El desarrollo de métodos de identificación, profilaxis y tratamiento contra los agentes causales de la epididimitis han tomado gran importancia. Conocer los mecanismos involucrados en la inducción de la respuesta inmune que se activa (celular, humoral o ambas) al haber infección por *H. somni* para así conocer la patogenia específica de este microorganismo.

III. HIPÓTESIS.

Si se utiliza una cepa de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) y se inocular en un grupo de ratones, con ello se inducirá una respuesta inmune, y al realizar la determinación de niveles de citocinas como son: IL-2, IL-4 e IFN- γ entonces se podrá determinar que tipo de respuesta se activa, ya sea humoral, celular o ambas.

IV. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Determinar si la respuesta inmune inducida por *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) es humoral, celular ó ambas mediante la inducción de citocinas: IL-2, IL-4 e IFN- γ en cultivo celular a partir de bazos de ratones previamente inmunizados.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Inmunización de ratones Balb/c con células completas de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*).
- Realizar cultivo celular a partir de bazos de ratones Balb/c, previamente inmunizadas con células completas de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*).
- Cuantificar la concentración de IL-2, IL-4 e IFN- γ , en el sobrenadante del cultivo celular a las 24, 48, 72 y 96 horas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Pruebas de identificación microbiológica y morfología colonial para *Histophilus somni*

a) Identificación de *Histophilus somni*.

Se realizó la reconstitución de la cepa de *H. somni*, para luego inocularla en Agar Sangre (5-10%) y Agar Soya Trypticaseína e incubarlas 24 horas a 37°C en la Estufa de CO₂ Thermolyne al 10%.

Posteriormente se realizaron pruebas de Gram, Catalasa, Citratos, Oxidasa, OF (Oxido-Fermentación), Motilidad, Nitratos, Indol, RM (Rojo de Metilo), VP (Voges – Proskauer), LIA (Agar Hierro Lisina).

5.2 Preparación y obtención del inóculo de *Histophilus somni*.

La cepa de *H. somni* se sembró en Agar Sangre e incubó de 24 - 48 horas a 37 ° C en anaerobiosis con 10% de CO₂ en la Estufa de CO₂ Thermolyne. Para luego cosechar las células bacterianas mediante lavados con SSF estéril y después centrifugarlas a 1000 X g por 15 minutos. Posteriormente se resuspendió la pastilla en agua desionizada y congelarla hasta su utilización.

5.3 Protocolo de inmunización de *H. somni*.

Se inmunizaron por vía intramuscular 25 ratones machos de la cepa Balb/c, de 4-5 semanas de edad con células completas de *H. somni*, antes y después de la inmunización se tomó una muestra de sangre y se determinó mediante DOT-ELISA la presencia de anticuerpos.

Después de 20 días por vía intramuscular (IM) se reinocularon, con un volumen de 0.2 ml, de células completas de *H. somni*.

Luego de cuatro semanas, un grupo de 15 ratones fueron sacrificados, para obtener los bazos (Salas, 2004).

5.4 Preparación del cultivo primario de células del bazo de ratón.

5.4.1 Cultivo celular.

Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar (Salas, 2004), el cual se describe a continuación:

- a) Se obtuvieron los bazos de los ratones, para eliminar los restos de sangre se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks (HBSS).
- b) Se colocaron en una caja de Petri la cual contenía 10 ml de medio RPMI 1640 (Sijma – Aldrich) con 100 U/ml de penicilina, 100 µg de estreptomicina (Gibco), y con un pedazo de gasa estéril, se envolvieron, lo cual sirvió como tamiz para retener los restos de tejido.
- c) Con la finalidad de disgregar los bazos se maceraron cuidadosamente con el émbolo de una jeringa estéril.
- d) La suspensión celular resultante se colocó en un tubo cónico estéril de 50 ml se adicionaron 10 ml de medio RPMI con antibióticos; se dejó reposar 5 minutos para sedimentar los restos de tejidos.
- e) Se decantó el sobrenadante a otro tubo cónico teniendo cuidado de no tomar el sedimento ya que son restos de tejido, se centrifugó 10 minutos a 10,000 *X g* a temperatura ambiente.
- f) Se decantó el sobrenadante y el botón celular resultante se resuspendió en 1 ml de Cloruro de amonio (Merck) a 0.17 M, la suspensión se mantuvo a una temperatura de 4 ° C por cinco minutos para lisar eritrocitos.
- g) Después de los cinco minutos la suspensión se centrifugó nuevamente 10 minutos a 10,000 *X g*.
- h) El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con 10 ml de medio RPMI con antibióticos; se centrifugó 10 minutos a 10,000 *X g*.
- i) Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 10 ml de medio RPMI con antibióticos, se centrifugó 10 minutos a 10,000 *x g*.
- j) El botón resultante se resuspendió en medio RPMI con antibióticos, SFB al 20% (GIBCO), L- glutamina 200 mM y aminoácidos 0.1 mM.

- k) Se tomaron 100 μL de la suspensión celular, se mezclaron con 100 μL de azul de Tripán al 10% para realizar el conteo en la cámara de Neubauer.
- l) La concentración celular se ajustó a 5.8×10^6 células/ml.
- m) A 21 pozos por placa de cultivo celular (Marca Nunc de 96 pozos de fondo plano) se le adicionó 1 ml de la suspensión celular (Se utilizaron 3 placas).

5.4.2 Inoculación del cultivo primario de células del bazo de ratón. (Salas, 2004).

- a) A 15 pozos de cada una de las placas de cultivo celular que contenían 1 ml de suspensión celular de bazo de ratón a una concentración de 5.8×10^6 células/ml; fueron inoculados con 10 μL de una suspensión de 2×10^8 UFC/ml células completas de *H. somni* para estimular la producción de citocinas "in vitro".
- b) Como control positivo se utilizaron 6 pozos por placa, los cuales fueron inoculados con 10 μL de concanavalina A con una concentración de 5 μL (Sigma Chemical Co.).
- c) Para el control negativo se utilizaron 6 pozos por placa, en los cuales únicamente se utilizaron los sobrenadantes del cultivo sin inóculo.

La placa se incubó a 37 ° C a 5% de CO₂ (Estufa de CO₂ Thermolyne-Modelo 37900). Los sobrenadantes se colectaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación y fueron congelados hasta su uso a 4 ° C.

5.5 Medición de Citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ). (Salas, et. al, 2005).

Para la medición de citocinas se emplearon estuches comerciales (DUOSET Mouse IFN- γ , DUOSET Mouse IL-2 y DUOSET Mouse IL-4) de ELISA Development System (R & D Systems).

Procedimiento:

- a) Se depositaron 100 μL /pozo del anticuerpo de captura a las microplacas (Marca C. T. L. de 96 pozos de fondo plano).

- b) Posteriormente se sellaron las microplacas e incubaron toda la noche a temperatura ambiente.
- c) A las 15 horas se aspiró y lavó cada pozo con amortiguador de lavado (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, filtrado en 0.2 μm) cada pozo se llenó con 400 μL y se realizó una perfecta remoción del amortiguador.
- d) Para el bloqueo de las microplacas se realizó un adición de 300 μL de amortiguador de bloqueo por pozo e incubó a temperatura ambiente una hora. Se aspiró y lavó.
- e) Para realizar la curva estándar por triplicado de cada una de las citocinas (IL-2, IL-4 e IFN-γ) para lo cual se depositaron 100 μL/pozo del estándar en una microplaca (Marca C. T. L. de 96 pozos de fondo plano).
- f) En otra microplaca (Marca C. T. L. de 96 pozos de fondo plano) se realizó por triplicado la adición de 100 μL/pozo de los sobrenadantes obtenidos en el cultivo de bazo de ratón que fueron recolectados a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas.
- g) Las microplacas fueron selladas y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente.
- h) Pasado el tiempo de incubación las microplacas fueron aspiradas y lavadas con amortiguador de lavado llenando cada pozo con 400 μL, con una perfecta remoción del amortiguador.
- i) Posteriormente se adicionaron 100 μL por pozo del anticuerpo detector, se cubrieron las microplacas e incubaron dos horas a temperatura ambiente, la solución se aspiró y lavó de cada microplaca.
- j) Finalmente se adicionaron 100 μL de Streptoavidina-HRP (horse radish peroxidase) a cada pozo, se cubrió e incubó por veinte minutos a temperatura ambiente, tratando de evitar el contacto con la luz directa, la solución se aspiró y lavó.
- k) Para el revelado se adicionaron 100 μL de solución de sustrato (H₂O₂ + tetrametilbencidina) a cada pozo, se incubó veinte minutos a temperatura ambiente.
- l) Para detener la reacción se agregaron 50 μL (H₂SO₄, 2N) por pozo, se mezcló bien y se realizaron lecturas de las microplacas (ELISA DYNEX MRX Revelation).

VI. RESULTADOS.

Para comprobar la pureza de la cepa de *H. somni* se realizaron diversas pruebas bacteriológicas obteniendo los siguientes resultados.

6.1 Tinción de Gram: cocabacilo corto, gram negativo, su morfología colonial es circular. Convexa, brillante, tamaño aproximado de 1 a 2 mm, pigmento ligeramente amarillento y consistencia similar a la mantequilla. (FIGURA 3)

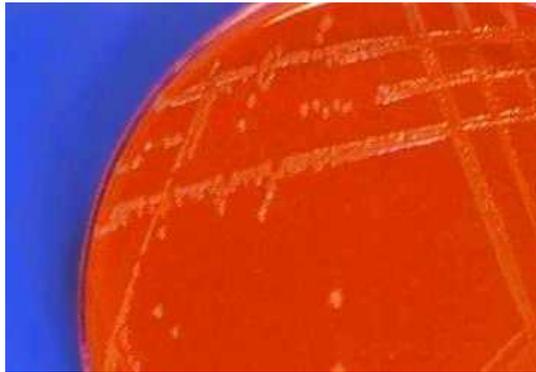


Figura 3: Colonias de *H. somni* en Agar Sangre

6.2 Pruebas Bioquímicas Primarias y Secundarias de *H. somni*

Oxidativo (O) / Fermentativo (F)	F
Oxidasa	+
Catalasa	-
Indol	+
Nitratos	+
Citratos	-
Rojo de metilo	-
Motilidad	-
Voges Proskauer	-
LIA (hierro lisina)	-

6.3 Cuantificación de citocinas

Al evaluar la producción de interleucinas en el cultivo celular de linfocitos T de bazo de ratón, previamente sensibilizados con células completas de *Histophilus somni*, el comportamiento mostrado en los sobrenadantes recolectados a las 24, 48, 72 y 96 horas podemos observar que la mejor inducción fue para la IL-4 la cual presentó 413, 429, 445 y 388 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En el caso de la IL-2 los valores fueron más fluctuantes teniéndose: 232, 144, 246 y 128 $\mu\text{g/ml}$ a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente. Finalmente el IFN- γ mostró una pobre inducción teniendo una concentración máxima de 38.76 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas para finalizar a las 96 horas con 29.43 $\mu\text{g/ml}$. (ver Tabla 6).

TABLA 5

Concentración de Citocinas obtenidas en el sobrenadante del cultivo de células *in vitro* de bazo de ratón estimuladas con *Histophilus somni*

	IL_2	IL-4	IFN- γ
Horas	$\mu\text{g/ml}$		
24	232.08	413.19	20.61
48	144.96	429.38	38.76
72	246.6	445.57	31.5
96	128.36	388.91	29.43

Al analizar el **GRÁFICO 1** se observa que la IL-4 a las 24 horas tuvo una concentración De 413.19 $\mu\text{g/ml}$, luego aumentó a las 48 horas con una concentración de 429.38 $\mu\text{g/ml}$, obteniéndose el máximo de 445.57 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 horas para disminuir a 388.91 $\mu\text{g/ml}$ a las 96 horas. Por otro lado la IL-2 tuvo una concentración de 232.08 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 horas, disminuyó a 144.96 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas, aumentó nuevamente a las 72 horas a una concentración de 246.6 $\mu\text{g/ml}$ y finalizó a una menor concentración, de 128.36 $\mu\text{g/ml}$. Con respecto al IFN- γ presentó una concentración de 20.61 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 horas, aumentó a las 48 horas a 38.76 $\mu\text{g/ml}$, disminuyendo a 31.5 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 horas y terminó con una concentración de 29.43 $\mu\text{g/ml}$.

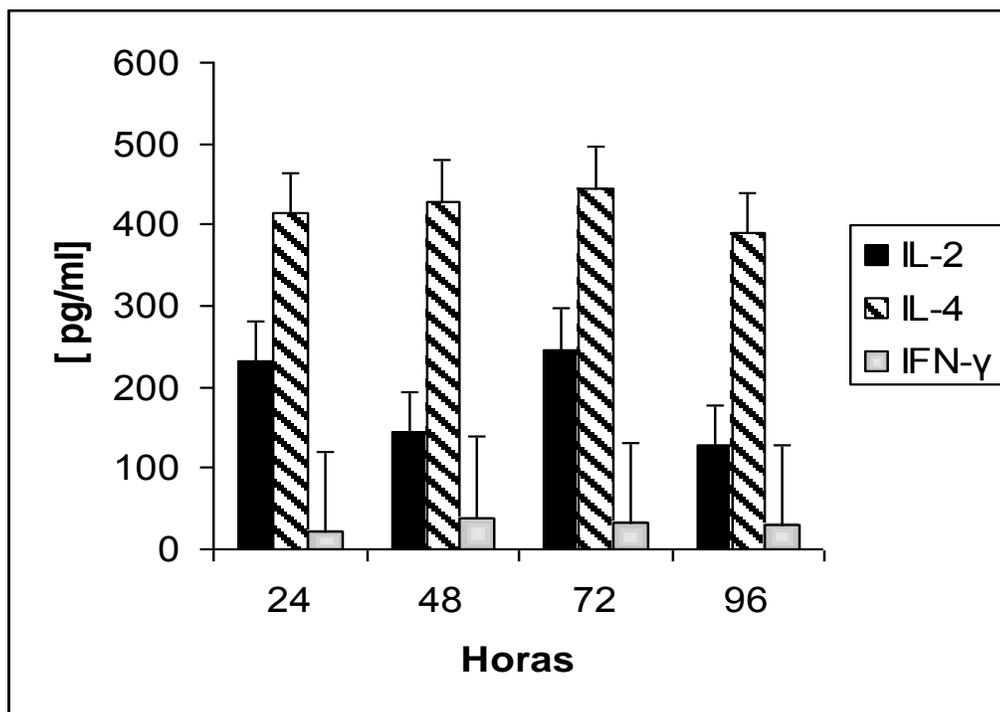


GRÁFICO 1

Concentración de IL-2, IL-4 e IFN- γ en sobrenadante de cultivo de células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con células completas de *H. somni* *in vitro*

VII. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se evaluó la inducción de citocinas a partir de una previa inmunización con células completas de *H. somni*, se comprobó la producción IL-2, IL-4 e IFN- γ , es capaz de activar a la célula completa de *H. somni*. La razón por la cual no se puede plantear de forma específica que componente es capaz de desencadenar la respuesta específica es por la complejidad componentes antigénicos.

Los LB son los responsables de la inmunidad humoral, es decir, la síntesis y secreción de anticuerpo. Una de las formas de activación de los LB, la primera la proporciona la interacción del anticuerpo con la inmunoglobulina en la membrana del LB, la otra la proporciona una serie de citocinas secretadas por los denominados LT cooperadores o CD4⁺. Significa que para que ocurra la activación de LB es necesaria la activación de LTCD4⁺, lo que implica la intervención de las denominadas CPA, que procesan al antígeno de manera que pueda ser reconocido por los LTCD4⁺. (Montaraz, 1997).

Las CPA toman a los antígenos de los espacios extracelulares (Ag exógenos) y mediante un mecanismo de fagocitosis o pinocitosis, los internalizan e incluyen en una vacuola eventualmente se fusiona con otra que contiene a los Ag clase II y transportados a la membrana de la CPA, donde será reconocido por los LTCD4⁺. Los LT activados de esta manera secretan una gama de citocinas que incluyen: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IFN- γ entre otras. (Montaraz, 1997).

Los LTCD4⁺ se activan cuando reconocen determinantes antigénicos acoplados a Ag clase II del CMH en la membrana de CPA. Existen 2 subpoblaciones de LTCD4⁺, Th1 y Th2. Cada una de ellas se asocia con el desarrollo ya sea de inmunidad humoral (Th2) o inmunidad celular (Th1). El mecanismo depende de las citocinas secretadas por cada una de estas subpoblaciones; Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-6 que actúan sobre los LB induciendo su replicación y la síntesis de Inmunoglobulina. Th1 secretan IFN- γ y TNF- α que activan a macrófagos permitiéndoles destruir microorganismos alojados en su interior. (Montaraz, 1997).

Este trabajo demuestra que al inocular, la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ inducida por los linfocitos de bazo de ratón sensibilizados con células completas de *H. somni*, muestra que este microorganismo despierta tanto una respuesta inmune humoral como celular, esto es debido a la elevada cantidad de IL-4 (72 horas) indicador de la respuesta humoral, y por otra parte la inducción de IL-2 (72 horas), así como del IFN- γ (48 horas) que son indicadores de una respuesta inmune celular. Por ello se sugiere una respuesta inmune combinada Th1/Th2.

Th1 y Th2 surgen de un LT progenitor designado Th0, y un factor importante en la dirección que tome Th0 son las citocinas producidas por las CPA. Así, cuando las CPA producen predominantemente IL-12, se generan Th1, y cuando producen IL-4 se generan Th2. Asimismo, durante el desarrollo de la respuesta inmune a un determinado Ag o microorganismo parece existir un antagonismo Th1-Th2 (las citocinas producidas por Th1 inhiben a Th2 y viceversa) de manera que una de las dos poblaciones prevalece sobre la otra; el resultado neto es la dominancia de la respuesta humoral o celular, según el caso. En una infección, esto puede tener consecuencias vitales, ya que de acuerdo con el tipo de microorganismo un tipo de respuesta es más eficiente que otra. En términos generales la respuesta humoral es efectiva contra patógenos extracelulares y la celular contra patógenos intracelulares. (Montaraz, 1997).

Hay dos maneras sencillas y complementarias de dividir las infecciones bacterias. Por una parte, considerando los mecanismos de patogenicidad, un tipo de bacterias se caracteriza por producir potentes exotoxinas (por ejemplo: *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphteriae*, *Clostridium tetani*, etc). En el otro extremo del espectro se encuentran bacterias invasivas (por ejemplo: micobacterias). (Montaraz, 1997).

Entre ambos extremos hay una gama de microorganismo que combinan estos dos tipos de patogenicidad. También existen bacterias cuyo nicho en el organismo es totalmente extracelular (por ejemplo *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) así como también las hay fundamentalmente intracelulares (por ejemplo: *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*). En términos

generales la inmunidad humoral se dirige a bacterias extracelulares o productoras de exotoxinas, mientras que la inmunidad celular se dirige hacia bacterias intracelulares o invasivas. (Montaraz, 1997).

VIII. CONCLUSIONES

- El desarrollo del presente trabajo y los resultados obtenidos al cuantificar citocinas permite determinar el tipo de respuesta inmune inducida por *Histophilus somni*, mediante la inducción de citocinas: IL-2, IL-4 e IFN- γ , la cual resulto ser del tipo Th1 y Th2 (respuesta humoral y celular).
- Sin embargo, requiere mayor investigación acerca de los diversos antígenos inmunogénicos que constituyen a *H. somni* y su correspondiente evaluación inmunológica.

IX. REFERENCIAS

9.1 Referencias bibliográficas y hemerográficas.

- Abbas, Abul K, Lichtman, Andrew H., Pober, Jordan S. 1999. Inmunología celular y molecular. Editorial Mc Graw Hill•Interamericana. España, 3ª Edición. Páginas: 275-308.
- Acosta, J. (2001). Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos. Tesis de Maestría en Microbiología. FES Cuautitlán. Páginas: 13-15.
- Aguilar, F., Trigo, F., Herrera; E., Ávila, J., Suárez, F. *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) aislado en casos de problemas del aparato reproductor de ganado lechero. Primer informe en México. 2005. Técnica Pecuaria en México. 43: 185-195.
- Angen, O., Ahrens, P., Tegmeier, 1998. Development of PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure abdoixed cultures. Vet. Microbiol. 63, 39-48.
- Angen, O., Ahrens, P., Kuhnert, P., Christensen, H., Mutters, R., 2003. Proposal of *Histophilus somnus* gen.nov.sp.nov. for the three species incertae sedis "*Haemophilus somnus*", "*Haemophilus agni*"and "*Histophilus ovis*". Int J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1449-1456.
- Antognoli, M., Blanco, J., Nader, A., Moreira, A. R. 1996. Boletín 11 Tuberculosis y Paratuberculosis. Centro Veterinario Diagnóstico.
- Appuhamy, J. G. Coote. 1998 PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. Journal of Clinical Microbiology. Mar. Páginas 814-817.
- Bach, Jean-Francois. 1984. Inmunología. Editorial Limusa. México. Páginas: 155-225; 408-412.
- Baynes, I. D. And Simmons, G. C. 1960. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* spp. Australian Veterinary Journal. 36: 454-459.
- Biberstein, E. L.; McGowan, B.; Olander, H.; Kennedy, P.C. 1964 Epididymitisun rams studies on pathogenesis. Cornell Veterinarian. 54 (4): 27-41.

- Brown, G. M.; Pietz, D. E.; Price, D. A. 1973. Studies on the transmission of *B. ovis* infection of rams. Cornell Veterinarian. 63 (12): 29-40
- Burgess, H. W. 1982. Ovine contagious epididymitis: a review. Vet Microbiol. 7 (6): 551-575
- De Freitas, A., Riet Correa, F., Cuenca, L., Quintana, E. 1980. Cuadro seminal de carneros afectados por epididimitis por *Brucella ovis*. Veterinaria, 72: 25-39.
- De la Puente – Redondo, V. A., García, B. N., Perez, M. C., González, R. M. C., Rodríguez, F. E. F., Gutierrez, M. C. B. 2000. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. J Comp Pathol; 122 (2-3): 217-222.
- De Long, W. J., Waldhalm, D. G. & Hall, R. F. 1979. Bacterial isolates associated with epididimitis in rams from Idaho and easterns Oregon flocks. Am J Vet Res. 40 (1): 101-102.
- Egerton, J. R. 2000. Foot-rot and other foot conditions. In Diseases of sheep, 3rd Edition. W. B. Martin and I. D. Aitken. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. (8): 243-249
- Ekdahl, M. O., Money, D. F. L., Martin, C. A. 1968. Some aspects of epididimitis of rams in New Zealand. N. Z. Vet J. 16 (5): 81-82.
- Fodor, L., Varga, J., Hajtos, I., Szemerédi, G. 1984. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep, goats and calves. Zbl. Vetmed. B, 31: 466-469
- García-Delgado, G.A., Little, P. B., Barnum, D. A. 1977. A Comparison of Various *Haemophilus somnus* Strains. Can. J. comp. Med. 41: 380-388.
- Genetzky, R. M. Epididymitis in Rams. The Compendium Food Animal. 1995; 17 (3): 447-454.
- Janeway, Charles. 2003. Inmunobiología. Editorial Masson. España, 2ª Edición. Páginas: 295-380.
- Jánosi, K., Hajtós, I., Makrai, L., Gyuranecz, M., Varga, J., Fodor, L. 2009. First isolation of *Histophilus somni* from goats. Veterinary Microbiology. 133: 383-386.
- Lozano, E. A. 1986. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididimitis. American Journal Veterinary Research. 47 (5): 1153-1156.
- Margni, Ricardo. 1996. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. Argentina, 5ª Edición. Páginas: 231-256.

- Méndez Narez, Graciela, Díaz Aparicio, Efrén, Morales Álvarez, José Francisco, Aguilar Romero, Francisco, Suárez Güemes. 1999. Epididimitis ovina: Estudios bacteriológico y serológico. Vet. Mex. 30 (4): 329-336.
- Miller, R. B., Barnum D. A., McEntee, K. E. 1983. Haemophilus somnus in the reproductive tracts of slaughtered cows: location and frequency of isolation and lesions. Vet Patholol. 20 (5): 515-521.
- Montaraz, Juan Antonio (1997). Introducción a la Inmunología. UNAM, FES Cuautitlán. México. Páginas: 25, 67, 68, 81, 85-87.
- Neath, P. H., Stevens, M. 1990. Actinobacillus rossi sp. Nov., Actinobacillus seminis sp. Nov., nom. Rev., Pasteurella bettii sp Nov., Pasteurella lymphangitidis sp. Nov., Pastereulla mairi sp. Nov., and Pasteurella trehalosi sp. Nov. Int J SystBacteriol. 40 (2): 148-153.
- Nicolet, Jacques.1986.Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Editorial Acribia. España. Páginas: 43-60.
- Oviedo, F. C., Hernández, V. C., Hernández, G. S., Reyes, G. A. 1988. Epididimitis ovina (Brucella ovis). Diagnóstico, Prevalencia y descripción en el Estado de México. Memorias del 1er Congreso Nacional de la Producción ovina. La Calera, Zacatecas. México.
- Palomares, G., Aguilar, F., Hernández, L., Acosta, J., Herrera, E., Tenorio, V. 2005. Isolation and characterization of Histophilus somni (Haemophilus somnus) in semen simples of rams with epididymitis. Small Ruminant Research 60: 221-225.
- Patlani, M. (2007). Evaluación de la respuesta inmune inducida por una cepa de Actinobacillus seminis en el modelo murino. Tesis de Licenciatura de QFB. FES Cuautitlán.
- Pérez, D. S., Pérez, F. A., Bretschneider, G. 2010. Histophilus somni: Pathogenicity in cattle an update. Anales de Veterinaria de Murcia. 26: 5-21.
- Robles, C. A., Urcullu, J. A., Uzal, F. A., Merlo, R. 1990. Primer Diagnóstico en Patagonia de orquioepididimitis en carneros por bacilos pleomórficos gram negativos. Vet. Arg. 7 (67): 453-455.
- Robles, C. A. 1998. Epididimitis contagiosa de los carneros por Brucella ovis. Revista de Medicina Veterinaria.79 (1): 67-71.

- Roitt, Juan. 2000. Inmunología Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. España. Páginas: 185-206.
- Rojas Montoya, William. 2001. Inmunología. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia, 12ª Edición. Páginas: 134-148; 173-191
- Salas Téllez Enrique. (2004). Estudio de la respuesta inmune celular de fracciones subcelulares de *Brucella ovis*. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Reproducción y Salud Animal. FESC, UNAM.
- Salas-Téllez, E., Núñez del Arco, A., Tenorio, V., Díaz-Aparicio, E., de la Garza, M., Suárez- Güemes, F. 2005. Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon- γ in mice. The Canadian Journal of Veterinary Research. 69: 53-57.
- Stephens L.R., Humphrey J.D., Little P.B., Barnum D.A. 1983. Morphological, Biochemical, Antigenic, and Cytochemical Relationships Among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*. Journal of Clinical Microbiology. 17 (5): 728 -737.
- Tegmeier, C., Angen, O., Ahrens, P., 2000. Comparison of bacterial cultivation, PCR, in situ hybridization and immunohistochemistry as tool for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. Vet. Microbiol. 76, 385-394.
- Van Tonder, E. M. 1979. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problema. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 46 (3): 129-133.
- Walker, R. L., Leamaster, B. R. 1986. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the tract of sheep. Am J Vet Res. 47 (9): 1928-1930.
- Walker, R. L., Leamaster, B. R., Stellflug, J. N., Biberstein, E. L. 1986. Association on age of rams with distribution of epididymal lesions an etiologic agent. J Am Vet Med Ass. 188 (4): 393-396.
- Walker, R. L., Leamaster, B. R., 1986. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. Am J Vet Res. 47 (9): 1928-1930.
- Watt, D. A. 1970. Investigation of ovine brucellosis in Merino Rams of Western Australian. Australian Veterinary Journal. 46 (10): 506-508.

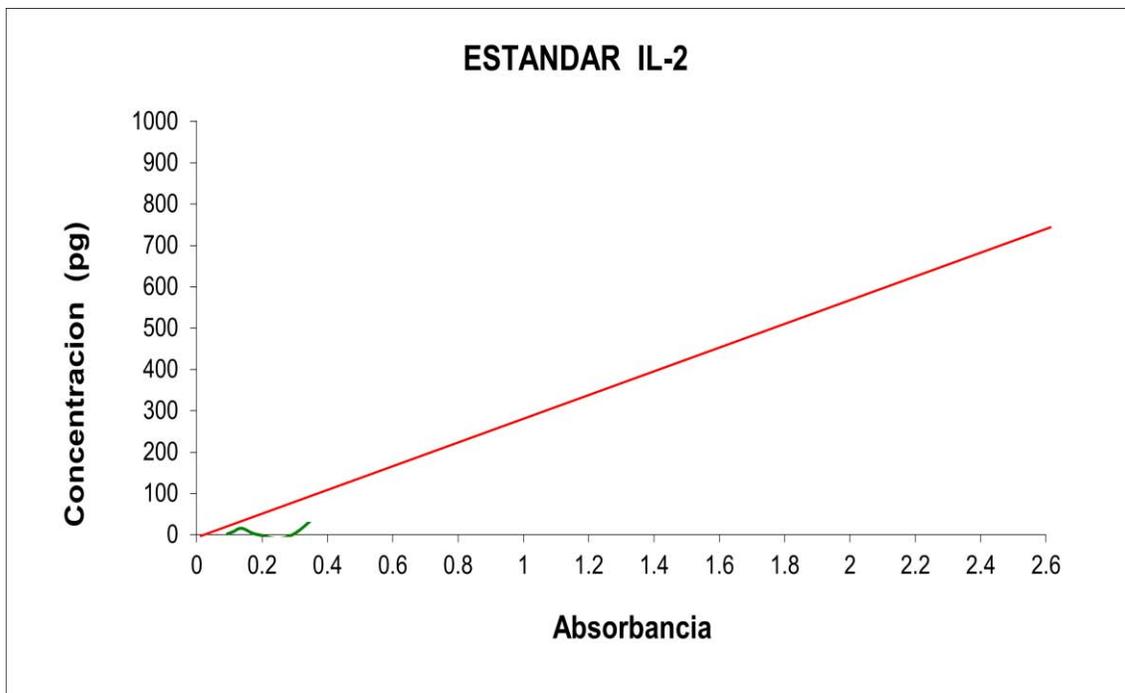
- Watt, D. A. 1966. Some aspects of reproductive wastage in rams. Australian Veterinary Journal. 42 (6): 437- 439.
- Yang, Y. F., Sylte, M. J. & Czuprynski, C. J. 1998. Apoptosis: a possible tactic of Haemophilus somnus for evasion of killing by bovine neutrophils?. Microbial Pathogenesis. 24: 351-359.
- Zambrano Villa, Sergio. 1998. Manual de Inmunología Básica y Clínica. Editorial Ciencia y Cultura Latinoamérica. México. Páginas: 127-168.

9.2 Referencias electrónicas

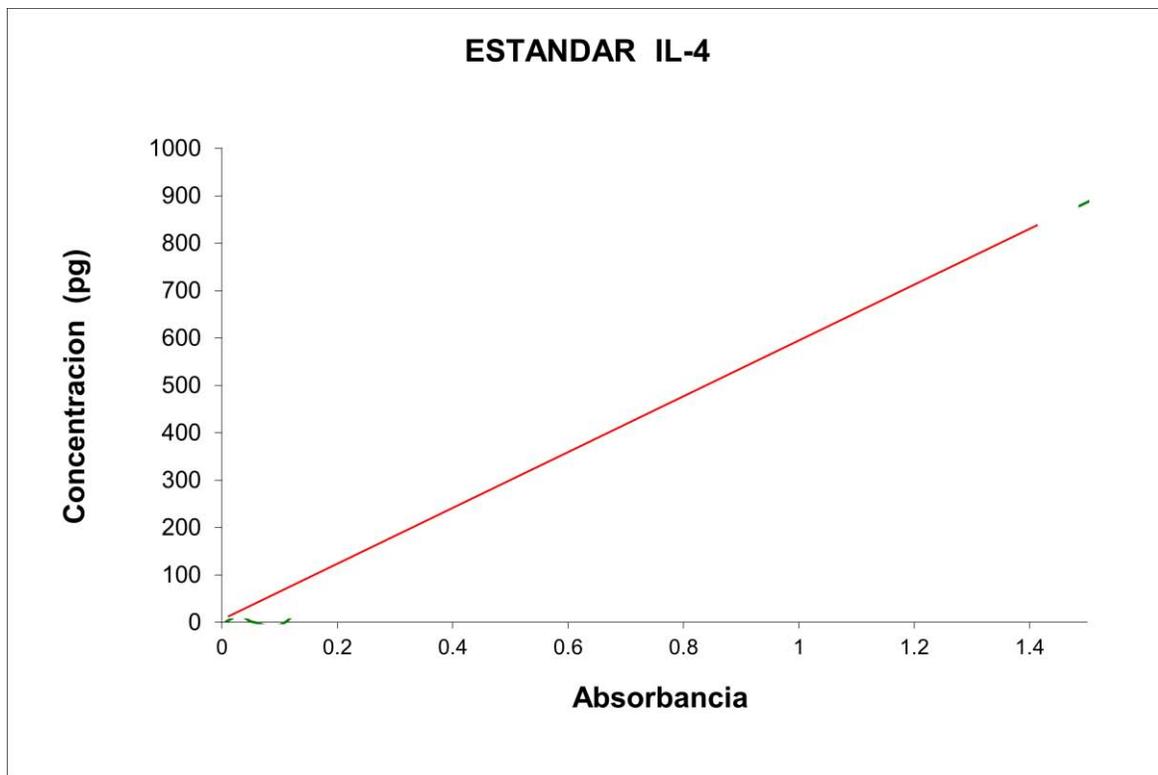
- Zielinski, Gustavo. 2000. Haemophilus somnus: etioepidemiología, patogenia, cuadros clínicos, prevención y control. Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino, F.A.V. UNRC, Río Cuarto, junio. www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/sanidad/11-haemophilus_somnus_etioepidemiologia_patogenia.htm.
- Aborto Bovino. Dr. Leonardo J. De Luca (Laboratorios Burnet) www.vet-uy.com/articulos/artic_bov/002/bov_002.htm - 124k.
- www.a14.san.gva.es/laboratorio/Web/Citocinas.htm.
- www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias/articulo_sanidad.pdf.
- <http://www.mbm.com.mx/copan/transporte.php>
- Imágenes: *Efectos biológicos de Th 1 y Th 2, Receptores y mecanismo de acción del IFN*. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimicaanterior/citoquinas.htm>.
- www.pulso.com/medvet/Protegido/numero1-02/bacterias/bacterias.htm.

X. ANEXO DE CURVAS ESTÁNDAR

10.1 CURVA ESTANDAR DE IL-2



10.2 CURVA ESTANDAR DE IL-4



10.3 CURVA ESTANDAR DE IFN- γ

