

107
Reg.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACION DE LINFOCINAS EN
SOBRENADANTE DE ESPLENOCITOS DE POLLO
ESTIMULADOS CON CONCANAVALINA A.

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

POR

GABRIELA GUADALUPE GOMEZ VERDUZCO

Asesor Principal: Ph. D. Vianney Ortiz Navarrete

Coasesor: Ph. D. Guillermo Téllez Isaías

FALLA DE ORIGEN



MEXICO. D. F.

1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**IDENTIFICACION DE LINFOCINAS EN SOBRENADANTE
DE ESPLENOCITOS DE POLLO ESTIMULADOS CON
CONCAVALINA A.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

por

GABRIELA GPE. GOMEZ VERDUZCO

ASESOR PRINCIPAL: Ph.D Vianney Ortiz Navarrete

COASESOR : Ph. D. Guillermo Téllez Isaías

México, D. F

1995

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica de Inmunoquímica en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Seguro Social. Así como en el Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Para la realización de esta tesis fungieron como asesores

**QFB. Vianey Ortiz Navarrete Ph D.
MVZ . Guillermo Téllez Isaías Ph D.**

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS .

A mis **PADRES** (Toño y Lupis) como una pequeña muestra de todo el **amor, respeto y admiración** que les tengo; además quiero agradecerles el haberme otorgado la vida, el estar conmigo en cada momento, el apoyo que incondicionalmente siempre me han brindado, y lo más importante, el enseñarme a vivir, disfrutar, saborear y amar plenamente el estar vivo! .

Los mejores ejemplos son los suyos, me siento muy orgullosa de ustedes,

¡LOS ADORO!

A mis **HERMANOS: CARMEN y BAYLE, TOÑO y SUSI, CHAT y JAIME** y mi querida **LILU**, por todos los momentos super increíbles que hemos pasado siempre juntos, y por su apoyo a lo largo toda mi vida. Los quiero muchísimo y estoy más que orgullosa de cada uno de ustedes.

A las ratitas pijosas más locas e increíbles que me tienen loca: **Gori y Markis**

A la **Gran Amparito** por depositar en mi todo su amor, confianza y apoyo, que está más que correspondido. Gracias por enseñarme, a obtener siempre lo que se quiere, y a enfrentar la vida con valentía; que mejor ejemplo que tú.

¡¡TE QUIERO Y ADMIRO MUCHO!!

A mi querida **Cuncun**, por las largas tardes de estudio que pasamos juntas, en tu casa, tus deliciosas comidas y cenas. Sobretudo gracias por tu apoyo y amor.

¡¡ERES LA MEJOR ABUE Y TE QUIERO MUCHO!!

A mi amado **Old Man** por todo tu **AMOR, CONFIANZA y APOYO** que has demostrado en todo momento, por compartir y asimilar conmigo todos los momentos buenos y malos. Por tu increíble **COMPRESIÓN y ENTUSIASMO** en mi realización, pero sobretodo, te agradezco el enseñarme otra forma de ver la vida .

¡TE ARCHIRREQUETECONTRAADORO!

123

A Memo Téllez, un doctor con una calidad humana incomparable. 1,000,000 de gracias por todo, todo, todo tu apoyo. Gracias por confiar y creer en mí.

¡¡Con toda la admiración!!

A Vianney un gran, gran, gran doctor. (casi genio) que más que un asesor es un amigo, gracias por creer en mí, y ayudarme siempre.

¡Con toda la admiración !

Al Dr. Armando Islbasi por permitirme trabajar dentro de un equipo de trabajo único.

A Naty, 1, 000, 000 de gracias por todo el tiempo que dedicaste en mí.

A todas las personas y animales sacrificados que contribuyeron para mi formación profesional.

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

GABRIELA

CONTENIDO.

PAGINA

1.- RESUMEN.....	1
2.- GENERALIDADES	
I. Descubrimiento y caracterización de las citocinas.....	2
✓ Cuadro I. Citocinas Mediadoras de la Inmunidad Natural.....	4
✓ Cuadro II. Citocinas Mediadoras de la Activación, Crecimiento y Diferenciación Linfocitos.....	5
✓ Cuadro III. Citocinas Mediadoras de la inflamación.....	6
✓ Cuadro IV. Citocinas Mediadoras del Crecimiento y Diferenciación de leucocitos Inmaduros.....	7
II. Patogenia de algunas bacterias intracelulares facultativas.....	8
III. Inmunidad contra <i>Salmonella sp.</i>	9
3.- INTRODUCCION.....	13
4.- HIPOTESIS.....	14
5.- OBJETIVOS.....	16
6.- MATERIALES Y METODOS	
* Material infectante.....	17
* Pollos para experimentación.....	17
* Inmunización de las aves.....	17
* Purificación y Activación de Linfocitos T.....	18
* Preparación de Linfocinas.....	18
* Preparación de Sobrenadante de Cultivo Mixto.....	19
* Obtención de Linfoblastos.....	20
* Bioensayo para la identificación de IL-2	20
* Bioensayo para la identificación de INF- γ	21
* Análisis Estadístico.....	22

7.- RESULTADOS.....	23
Figura 1. Proliferación de blastos de pollo por ILKSe.....	26
Figura 2. Proliferación de blastos de pollo por ILKSg.....	27
Figura 3. Ausencia de proliferación de la línea CTLL-2 por ILKSe.....	28
Figura 4. Testigos negativos.....	29
Figura 5. Proliferación de la línea CTLL-2 con IL-2r.....	30
Figura 6. Actividad de Interferon- gamma en ILKSe (Aumento de moléculas clase I del CPH).....	31
Figura 7. Actividad de Interferon- gamma en ILKSe (Aumento de moléculas clase II del CPH).....	32
Tabla I . Resultados estadísticos en la inducción de moléculas clase I del CPH de pollo.....	33
Tabla II . Resultados estadísticos en la inducción de moléculas clase II del CPH de pollo.....	34
8.- DISCUSION.....	35
9.- CONCLUSIONES.....	37
10.- LITERATURA CITADA.....	38
11.- GLOSARIO.....	41

1.-RESUMEN

GOMEZ VERDUZCO, GABRIELA. IDENTIFICACION DE LINFOCINAS EN SOBRENADANTE DE ESPLENOCITOS DE POLLO ESTIMULADOS CON CONCAVALINA A.

(Bajo la asesoría de: QFB. Ph D. Vianney Ortiz Navarrete., MVZ Ph D. Guillermo Téllez Isaias.)

Estudios realizados anteriormente, han demostrado una protección al desafío experimental contra infecciones causadas por *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* en pollos, mediante la manipulación del sistema inmunocompetente de las aves, a través del uso de extracto crudo de linfocinas (ILK) obtenido de linfocitos T de aves hiperinmunizadas con *Salmonella gallinarum* (ILK-Sg) o *Salmonella enteritidis* (ILK-Se); y reestimulados con concanavalina A. Con el objetivo de identificar las interleucinas presentes en el ILK, se evaluó la presencia de Interleucina-2 (IL-2) e Interferon-gama (INF γ). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de ambas interleucinas en ILKSe. La IL-2 de pollo al igual que en otros mamíferos; participa en la proliferación de linfocitos T, sin embargo una diferencia notable con otras especies, es que se observó barrera de especie en su actividad biológica. El INF γ indujo aumento en la expresión de moléculas clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad. La presencia de INF γ en el sobrenadante, sugiere que esta interleucina pudiera estar participando en el efecto de protección que se confiere por la administración de ILK, promoviendo la activación de macrófagos y heterófilos, los cuales pudieran ser los responsables de la eliminación de la bacteria. Estos estudios además proveen más evidencias de que la inmunidad observada en los estudios *in vivo* contra *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* es probablemente inducida por estas importantes linfocinas, estudios para purificar e identificar los genes de las linfocinas efectoras en pollos, así como una investigación sistémica del mecanismo por el cual estas linfocinas potencializan sus efectos protectores se encuentran en progreso.

GOMEZ VERDUZCO, GABRIELA. IDENTIFICACION DE LINFOCINAS EN SOBRENADANTE DE ESPLENCITOS DE POLLO ESTIMULADOS CON CONCAVALINA A.

(Bajo la asesoría de: QFB. Ph D. Vianney Ortiz Navarrete., MVZ Ph D. Guillermo Téllez Isaías.)

Estudios realizados anteriormente, han demostrado una protección al desafío experimental contra infecciones causadas por *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* en pollos, mediante la manipulación del sistema inmunocompetente de las aves, a través del uso de extracto crudo de linfocinas (ILK) obtenido de linfocitos T de aves hiperinmunizadas con *Salmonella gallinarum* (ILK-Sg) o *Salmonella enteritidis* (ILK-Se); y reestimulados con concanavalina A. Con el objetivo de identificar las interleucinas presentes en el ILK, se evaluó la presencia de Interleucina-2 (IL-2) e Interferón-gama (INF γ). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de ambas interleucinas en ILKSe. La IL-2 de pollo al igual que en otros mamíferos; participa en la proliferación de linfocitos T, sin embargo una diferencia notable con otras especies, es que se observó barrera de especie en su actividad biológica. El INF γ indujo aumento en la expresión de moléculas clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad. La presencia de INF γ en el sobrenadante, sugiere que esta interleucina pudiera estar participando en el efecto de protección que se confiere por la administración de ILK, promoviendo la activación de macrófagos y heterófilos, los cuales pudieran ser los responsables de la eliminación de la bacteria. Estos estudios además proveen más evidencias de que la inmunidad observada en los estudios *in vivo* contra *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis* es probablemente inducida por estas importantes linfocinas, estudios para purificar e identificar los genes de las linfocinas efectoras en pollos, así como una investigación sistémica del mecanismo por el cual estas linfocinas potencializan sus efectos protectores se encuentran en progreso.

2.GENERALIDADES

I. DESCUBRIMIENTO Y CARACTERIZACION DE CITOCINAS.

Cronológicamente, el descubrimiento de las citocinas se sitúa en los años 60s, cuando surge la pregunta ¿De que manera las células del sistema inmune se comunicaban entre sí?. En investigaciones realizadas en esa época, con cultivos de linfocitos *in vitro*, estimulados con agentes mitogénicos, antígenos y células alogénicas, se observó que estos linfocitos liberaban factores proteicos al medio, que al utilizarlos en bioensayos, desarrollaron funciones particulares como por ejemplo, inducir la proliferación de células B, y células T, diferenciación de células B a células plasmáticas (productoras de anticuerpos), desarrollo de células citotóxicas, activación de macrófagos y otras células inflamatorias. Fué en esta época cuando se describieron los interferones antivirales, pirógenos y factores activadores de macrófagos. (1,18)

La segunda etapa en la investigación de las citocinas fué durante la década de los 70s, involucrando la purificación y caracterización parcial de algunas citocinas, así como la producción de antisueros específicos neutralizantes. En esta época se observó que diversos efectos de las citocinas, que ya habían sido estudiados por diferentes investigadores, eran producidos por las mismas moléculas, por ejemplo; el interferon descubierto por virólogos como una proteína antiviral, fué descrito también de manera independiente por inmunólogos como un activador de macrófagos derivado de células T. Otro ejemplo es la Interleucina 1 (IL-1) la cual fué descrita como un mediador endógeno de la fiebre (pirógeno), producido en respuesta a infecciones bacterianas; y los inmunólogos la describen como un coestimulador de la activación de células T. (1,18, 20)

Una hipótesis importante generada en ese tiempo era que las citocinas eran sintetizadas principalmente por los leucocitos y que su sitio de

acción se llevaba a cabo en otros linfocitos. Por esta característica es que reciben el nombre de Interleucinas (IL's). (1,18,20)

La época de oro en la investigación de citocinas fué en la década de los 80's, debido a que en este año se logró la identificación individual y definitiva de las moléculas de las citocinas a través de la producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos; además de describir propiedades desconocidas; y lo más importante, la clonación de los genes de estas interleucinas. En la actualidad esta línea de investigación aún continua, ya que se conocen los efectos de las citocinas *in vitro*; pero las reacciones *in vivo* no están bien definidas, por lo que hay un largo camino que recorrer. (1,18,20)

Dependiendo de las actividades biológicas de las linfocinas, se han clasificado de la siguiente manera: Citocinas mediadoras de la inmunidad natural, Citocinas mediadoras de la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos, Citocinas mediadoras de la inflamación y Citocinas mediadoras del crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros. (ver cuadros I a IV)(1,18,20).

CUADRO I

CITOCINAS MEDIADORAS DE LA INMUNIDAD NATURAL

Citocina	Producida por	Cel. blanco	Efectos en cel. blanco
INF tipo I	Fagocitos mononucleares y otras (α), Fibroblastos y otras (β)	Todas (α) Cels. NK(β)	Anti viral, antiproliferativo, aumenta la expresión de moléculas clase I del CPH. Activación
TNF	Fagocitos mononucleares y células T	Neutrófilos Cél. endoteliales Hipotálamo e Hígado	Activación (inflamación) Activación (inflamación, coagulación) Fiebre Reacciones en fase aguda
Interleucina 1	Fagocitos mononucleares y otras	Cél. T, Cél B, Cél. endoteliales, Hipotálamo, Hígado Músculo y grasa	Coestimulador Activación (inflamación, coagulación) Fiebre Reacciones en fase aguda Catabolismo
Interleucina 6	Fagocitos mononucleares, Cél. endoteliales, células T	Cél. T, Cél B, Cél. B maduras Hígado	Coestimulador Crecimiento Reacciones en fase aguda
Citocinas de bajo peso molecular	Fagocitos mononucleares, Cél. endoteliales, fibroblastos, células T y plaquetas	Leucocitos	Quimiotaxis y activación de leucocitos

Ref (1)

Abreviaturas: INF, Interferon
TNF, Factor de necrosis tumoral

CUADRO II.**CITOCINAS MEDIADORAS DE LA ACTIVACIÓN, CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS.**

Citocina	Producida por	Cel. blanco	Efectos en cel. blanco
Interleucina 2	Céls. T	Céls. T Céls NK Céls. B	Creclimiento y producción de citocinas. Crecimiento y activación. Crecimiento y síntesis de anticuerpos
Interleucina 4	Céls. T CD4+	Céls. T Céls. B Fagocitos mononucleares y céls. B	Creclimiento Activación y crecimiento del isotipo IgE para Switch. Expresión de Fc
TGF-β	Células T, Fagocitos mononucleares y otras	Células T, Fagocitos mononucleares y otras	Inhibe la activación y la proliferación. Inhibe la activación Regulación del crecimiento.

Ref (1)

Abreviaturas: TGF- β , Factor de crecimiento tumoral beta
NK, células asesinas
Fc, Fracción cristalizable de las inmunoglobulinas

CUADRO III.

CITOCINAS MEDIADORAS DE LA INFLAMACION

Citocina	Producida por	Cel. blanco	Efectos en cel. blanco
Gamma Interferon INFγ	Cél. T Cél. NK	Fagocito mononuclear Cél. endotelial Céls. NK Todas	Activación Activación Activación Aumenta la expresión de moléculas clase I y II del CPH
Linfotoxina	Cél. T	Neutrófilo Cél. endotelial Céls. NK	Activación Activación Activación
Interleucina 10	Cél. T	Fagocito mononuclear Cél. B	Inhibición Activación
Interleucina 6	Cél. T	Eosinófilo Cél B	Activación Crecimiento y activación
Interleucina 12	Cél. T	Céls NK Céls. T	Activación Activación (crecimiento y diferenciación)
MIF	Cél. T	Fagocito mononuclear	Conversión de un estado

Ref (1)

Abreviaturas: NK, células asesinas

MIF, Factor inhibidor de migración

CPH, Complejo Principal de Histocompatibilidad

CUADRO IV.

**CITOCINAS MEDIADORAS DEL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACION DE LEUCOCITOS INMADUROS**

Citocina	Producida por	Cel. blanco	Efectos en cel. blanco
ligando de c-Kit	Cél del estroma de médula ósea	Cél. pluripotencial	Activación
Interleucina 3	Cél. T	Progenitora inmadura	Crecimiento y difreactivación
CSF-granulocitos-macrófagos	Cél. T, Fagocito mononuclear, Cél endotliai, fibroblastos	Progenitora inmadura Progenitor granulocito-monocito Fagocitos mononucleares	Crecimiento y diferenciación de todas las líneas celulares Diferenciación de granulocitos y fagocitos mononucleares Activación
CSF macrófagos	Fagocito mononuclear, Cél endotliai, fibroblastos	Progenitor granulocito-monocito	Diferenciación de fagocitos mononucleares
CSF granulocitos	Fagocito mononuclear, Cél endotliai, fibroblastos	Progenitor granulocito-monocito	Diferenciación de granulocitos
Interleucina 7	Fibroblastos, Célis del estroma de médula ósea	Progenitores inmaduros	Crecimiento y diferenciación de linfocitos B

Ref (1)

Abreviaciones: CSF, factor estimulador de colonias.

II. PATOGENIA DE ALGUNAS BACTERIAS INTRACELULARES FACULTATIVAS.

La mayoría de las bacterias intracelulares entran en el hospedero a través de las mucosas, y esta entrada es iniciada frecuentemente con la adherencia de la bacteria a células epiteliales de la mucosa. Esto lo pueden hacer a través de adhesinas expresadas en la superficie de la bacteria. A continuación la bacteria pasa a través de las células epiteliales por procesos de transcitosis. Posteriormente se localiza dentro de los macrófagos, mencionando algunas bacterias que llevan a cabo esta característica podemos mencionar a *Salmonella*, *Listeria* y *Mycobacterium*. (8)

La bacteria puede ser previamente eliminada por los mecanismos de defensa no específicos, como son: el movimiento mucociliar, movimientos peristálticos, o células polimorfonucleares que fagocitan a *Salmonella*. (8,18)

Las bacterias que resisten a ésta reacción de defensa no específica, colonizan tejidos más profundos, estableciendo un nicho de infección. En este caso, el hospedador desarrolla una respuesta inmune específica en contra de la bacteria. La infección es abortiva cuando el sistema inmune sigue con la eliminación del agente patógeno antes de que se desarrolle signología clínica. Alternativamente, el daño en tejidos aumenta a un nivel significativo antes que el sistema inmune pueda controlar al agente patógeno de manera efectiva; manifestándose la enfermedad clínicamente. Finalmente es posible que la respuesta inmune no pueda erradicar completamente al agente patógeno. En este caso se lleva a cabo un equilibrio a largo plazo entre la persistencia del microorganismo y el desarrollo de la respuesta inmune. Este balance puede inclinarse a favor del patógeno, y con el tiempo la infección se convierte en una enfermedad crónica, como pudiera ser el caso de la tuberculosis. (1,18,20).

III. INMUNIDAD CONTRA *Salmonella sp.*

El hecho que un microorganismo sea intracelular implica una coexistencia entre la bacteria y la célula hospedera, ocasionando daño en la célula. Esta característica provoca consecuencias directas en el tipo de respuesta inmune a desarrollarse; ya que su localización dentro de la célula protege a la bacteria de la inmunidad humoral (19).

La respuesta inmune protectora contra bacterias intracelulares, es por tanto, la inmunidad mediada por células; individuos con deficiencia en este tipo de respuesta, son extremadamente susceptibles a infecciones por organismos intracelulares. Esta inmunidad celular consiste en diferentes reacciones: primero la fagocitosis y destrucción de los microorganismos por los fagocitos mononucleares activados por **citocinas** que han sido liberadas principalmente de células T y por otras células, como por ejemplo las células NK. El **INF γ** ocupa un sitio de suma importancia en la activación de monocitos y macrófagos, ya que aumenta la fagocitosis elevando la expresión de las fracciones Fc de las IgG y aumenta la producción de productos oxidativos del oxígeno y nitrógeno. Posteriormente, los antígenos protéicos de la *Salmonella*, son procesados y presentados por los macrófagos como péptidos en el contexto de moléculas de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) a linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente. Los linfocitos CD8 actúan sobre las células que presenten péptidos unidos a moléculas de clase I del CPH, lisando estas células, mientras que los linfocitos CD4 responden liberando **interleucinas**, las cuales modulan la respuesta inmune. Se distinguen dos tipos de linfocitos T CD4; los Th1, responsables de la secreción de **IL-2** e **INF γ** ; y los Th2, que secretan **IL- 4**, **IL-5**, **IL-10**, que son linfocinas que participan en la respuesta inmune humoral. La respuesta de **Th1** se traduce predominantemente en una

respuesta inmune celular, promoviendo la activación de macrófagos y por lo tanto la eliminación de la *Salmonella*. (1,18,20).

3.-INTRODUCCION

Las infecciones paratifoideas por *Salmonella* en aves, se consideran como una fuente potencial de contaminación de alimentos para los humanos, por lo que es un tema de gran interés mundial.(4,5)

Con excepción de los países escandinavos y algunas áreas de operaciones localizadas, las infecciones paratifoideas son comunes en aves productoras de carne o huevo. Las infecciones humanas con *S. enteritidis* se han reportado con mayor problema en varios países de Europa; ocasionando del 50 al 87% del total de los casos reportados. (4,5).

Por otro lado tenemos lo referente a la infección por *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* que ocasionan en aves Tifoidea aviar y Pulorosis, respectivamente, no produciendo enfermedad en los humanos; pero son causantes de severas pérdidas económicas para los avicultores (6).

A pesar de los programas que se han implantado en todo el mundo de erradicación, bioseguridad, vacunación, desinfección y medicación, contra este microorganismo; esta enfermedad, continúa atacando la industria avícola representando un gran impacto sanitario y económico a esta actividad pecuaria. Por tal motivo, es necesario que esa industria cuente con métodos eficaces permitiendo la prevención de la enfermedad (6,10,23).

La vacunación tradicional de las aves contra *Salmonella gallinarum* con la cepa 9R induce un bajo porcentaje de protección al exponerse las aves vacunadas a cepas virulentas de campo, además; de generar un efecto adverso en la subsecuente producción de huevo; y la inmunidad inducida puede desaparecer 5 ó 6 meses después de la vacunación. Por lo tanto, su eficacia sólo tiene una aceptación desde el punto de vista de la industria farmacéutica.(6,24)

Las infecciones paratifoideas por *Salmonella* en aves, se consideran como una fuente potencial de contaminación de alimentos para los humanos, por lo que es un tema de gran interés mundial.(4,5)

Con excepción de los países escandinavos y algunas áreas de operaciones localizadas, las infecciones paratifoideas son comunes en aves productoras de carne o huevo. Las infecciones humanas con *S. enteritidis* se han reportado con mayor problema en varios países de Europa; ocasionando del 50 al 87% del total de los casos reportados. (4,5).

Por otro lado tenemos lo referente a la infección por *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* que ocasionan en aves Tifoidea aviar y Pulorosis, respectivamente, no produciendo enfermedad en los humanos; pero son causantes de severas pérdidas económicas para los avicultores (6).

A pesar de los programas que se han implantado en todo el mundo de erradicación, bioseguridad, vacunación, desinfección y medicación, contra este microorganismo; esta enfermedad, continúa atacando la industria avícola representando un gran impacto sanitario y económico a esta actividad pecuaria . Por tal motivo, es necesario que esa industria cuente con métodos eficaces permitiendo la prevención de la enfermedad (6,10,23).

La vacunación tradicional de las aves contra *Salmonella gallinarum* con la cepa 9R induce un bajo porcentaje de protección al exponerse las aves vacunadas a cepas virulentas de campo, además; de generar un efecto adverso en la subsecuente producción de huevo; y la inmunidad inducida puede desaparecer 5 ó 6 meses después de la vacunación. Por lo tanto, su eficacia sólo tiene una aceptación desde el punto de vista de la industria farmacéutica.(6,24)

Por lo que una alternativa para solucionar el problema de la salmonelosis en aves explotadas comercialmente es la manipulación del sistema inmunocompetente (23). Una opción puede ser la utilización de las Interleucinas (ILK's), que actúan como mediadores solubles de la respuesta inmune específica e inespecífica (12,13,15,16,25,27).

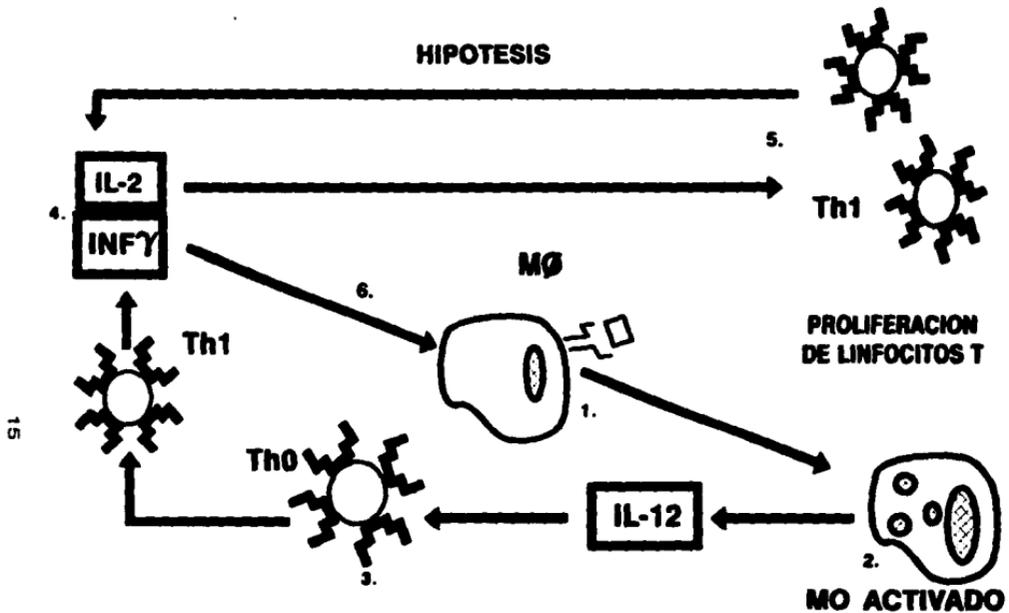
En estudios recientes se ha demostrado que linfocitos T provenientes de pollos hiperinmunizados contra *Salmonella enteritidis* producen linfocinas que protegen a las aves contra desafíos experimentales con *Salmonella enteritidis* el reto con la bacteria en dosis de 1×10^4 , 2.5×10^5 , y 1×10^6 Unidades Formadoras de colonia (UFC). Esta protección persiste durante por lo menos 6 días cuando se administran estas linfocinas un día después del nacimiento. Por lo que se considera una herramienta en el control de la salmonelosis en aves explotadas comercialmente (12,13,15,16,25,27).

En el control de enfermedades con microorganismos intracelulares, como es el caso de la Salmonelosis, la inmunidad específica por linfocitos T, juega un papel muy importante, ya que estas células T secretan interleucinas las cuales participan en múltiples y diferentes eventos de la respuesta inmune como son, proliferación celular (expansión clonal de linfocitos T y B), diferenciación de linfocitos B, activación de macrófagos y procesos de inflamación, sólo por mencionar algunas actividades. (1,16,18). En el ratón y el humano han sido caracterizadas las siguientes interleucinas: Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 3 (IL-3), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 12 (IL-12), IFN-gama (INF γ), TNF-Beta (TNF β), TNF-alfa (TNF α). (1,3,18,20). En lo referente a los animales domésticos se han caracterizado IL-8 e IL-2, e INF γ en bovinos (2,7,22). IL-2 en el gato, y en el pollo de engorda IL-2 e INF- γ . (9,14,17,26).

Considerando que en las aves las interleucinas poseen las mismas actividades biológicas que en los mamíferos, es importante caracterizar las linfocinas presentes en el extracto crudo obtenido de linfocitos hiperinmunizados con *Salmonella gallinarum*; o *Salmonella enteritidis*, y reestimulados con concavalina A (ILK-Sg e ILK-Se), para poder establecer, cuales interleucinas son las que participan directamente en el establecimiento de la protección observada contra infecciones de *Salmonella*.

4.-HIPOTESIS

La IL-2, e INF- gamma son de los principales componentes presentes en el sobrenadante de esplenocitos de pollo, estimulados con Concanavalina A (Con A).



15

Se cree que existe una respuesta Th1, y por lo tanto, la liberación de IL-2 e INF-gama principalmente.

1. Tenemos a un MO que está presentando un péptido antigénico.
2. Una vez activado el MO secreta IL-12
3. La IL-12 actúa en linfocitos Th0 y los transforma a Th1.
4. Se libera principalmente IL-2 e INF-gama.
5. IL-2, prolifera linfocitos T.
6. INF-gama, activa MO.

5.-OBJETIVOS

-Obtención de sobrenadante de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina A (Con A).

-Caracterización de las actividades de IL-2 y de IFN-gamma en el sobrenadante de esplenocitos estimulados con Concanavalina A (Con A).

6.-MATERIALES Y METODOS.

Material infectante.

Se utilizó una cepa de *Salmonella enteritidis*, donada por el National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowa. Y una cepa patógena de campo de *Salmonella gallinarum* donada por el Dr. Mario Padrón, denominada U-2. Estas cepas son resistentes a novobiocina y ácido nalidíxico por lo que se cultivaron en caldo infusión cerebro-corazón durante 18 hr a 37 C. Este medio de cultivo contenía 25µg / ml de novobiocina y 20 µg / ml ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de otras bacterias. El inóculo para el desafío de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum* fué preparado en un amortiguador de fosfatos estéril. La concentración de células viables del inóculo, fué determinada mediante espectrofotometría (Beckman 89212 Philadelphia, USA) y conteo de colonias en cajas con agar verde brillante.

Pollos para experimentación

Pollos de un día de edad (Arbor Acres X Arbor Acres) fueron obtenidos de una incubadora comercial, y colocados de manera aleatoria en una batería eléctrica situada en el Departamento de Producción Animal: Aves. Proporcionándoles agua y alimento comercial *ad libitum*, tomando muestras de ambos, para verificar que su inocuidad.

Inmunización de las aves

Aves de dos semanas de edad (Arbor Acres X Arbor Acres) se inmunizaron por vía oral con cepas de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella gallinarum*, el día 0 y el día 14 a una concentración 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) / ml.

Purificación y Activación de Linfocitos T.

Los bazos se extrajeron en forma aséptica y se colocaron en medio de cultivo celular RPMI 1640 (SIGMA, Saint Louis, MO, EUA), se disgregaron mediante la utilización de un tamiz, las células se recuperaron por centrifugación a 250 X g (Sorvall) 10 minutos, a continuación, el paquete celular se resuspendió en una solución para lisar eritrocitos (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 1.0mM, EDTA 0.1 mM) y se incubó 7 minutos a 37 C. Posteriormente los leucocitos se sometieron a dos lavados con solución balanceada de Hanks (SIGMA Saint Louis, MO, EUA). El paquete celular fue resuspendido en RPMI 1640; y para eliminar monocitos y linfocitos B, se pasaron a través de columnas de algodón de nylon (Polysciences, Inc), las cuales habían sido previamente incubadas 30 minutos a 37 grados centígrados, 5.0 % CO_2 con RPMI-10 (medio RPMI 1640 suplementado con piruvato de sodio, glutamina, suero fetal bovino (SFB) al 10%) (GIBCO). Los linfocitos T purificados se recolectaron como células que no se adherieron a la columna; posteriormente se ajustaron a 2×10^6 células/ml, la pureza y viabilidad se determinaron mediante exclusión con azul tripan obteniendo un 95%. Los linfocitos T se incubaron durante 48 horas con 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concanavalina A (Con A) (Pharmacia AB Sweden) el cuál es un mitógeno específico de linfocitos T. (19)

Preparación de linfocinas

A las 48 horas de incubación de los linfocitos T con la Con A, la suspensión celular se centrifugó a 250 X g, 20 minutos a 4 C, se recolectó el sobrenadante, y se le adicionó alfa-metil-manosido a una concentración final de 0.5 mM. Este material fue posteriormente ultrafiltrado a través de una membrana de 10 kd (Amicon) y el material retenido fue nuevamente esterilizado por filtración

utilizando membranas de 0.22µm. Alícuotas de 1ml de este material fueron conservadas a -70 C hasta su utilización.

Preparación de Sobrenadante de Cultivo Mixto.

Se obtuvieron esplenocitos de pollo de la forma descrita anteriormente, y se trataron durante 20 minutos a 37 C, en un ambiente con 5.0 % CO₂ con Mitomicina C (Sigma # M. 0503) a una dosis de 40µg/ml. Al término del período de incubación se lavaron tres veces con solución balanceadas de Hanks; y finalmente se ajustaron a una concentración de 3X10⁷ células / ml. (Grupo de células estimulador).

De otra ave alógena se obtuvieron igualmente los esplenocitos y se ajustaron a una densidad final de 3 X 10⁷ células / ml (Este grupo de células actuó como respondedor). Igual número de células respondedoras y estimuladoras se distribuyeron en botellas de cultivo celular de 25 cm² y se incubaron a 37 C, con 5.0% de CO₂, durante 14 días.(Cultivo Mixto Primario CMP). Al finalizar el tiempo de incubación, se cosecharon por centrifugación las células del CMP a 250 X g 10 min en botellas de cultivo celular, a temperatura ambiente (TA). Se lavaron una vez con 20 ml de RPMI-10 y se preparó un Cultivo Mixto Secundario (CMS), utilizando condiciones similares; excepto en la concentración de células respondedoras, colocándose 6 X 10⁶ células / ml (del CMP) y 2.5 X 10⁷ células / ml de esplenocitos estimuladores, y se cultivaron durante 36 horas. Al término de la incubación, se centrifugaron las células a 250 X g, 20 min, se recolectó el sobrenadante y se conservó a -70 C, hasta su utilización.

Obtención de Linfoblastos.

Los esplenocitos de pollo se incubaron durante 24 horas con 2.5 µg/ml de Con A. Al término del período de incubación se cosecharon por centrifugación, 10 min a 250 X g. Las células se lavaron dos veces con 20 ml de solución balanceada de Hanks. Los blastos se obtuvieron mediante un gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (SIGMA), para ello se colocaron volumen a volumen la suspensión de células y el Ficoll-Hypaque, se centrifugó a 250 X g, 20 minutos a temperatura ambiente. Al término, con una pipeta Pasteur se recolectó la interfase que contenía la suspensión de blastos, y se sometió a dos lavados con 20 ml de solución balanceada de Hanks. Finalmente se ajustaron a una concentración de 2×10^6 células / ml, para su posterior utilización en el ensayo de cuantificación de IL-2.

Bioensayo para la identificación de IL-2.

En una placa de 96 pozos (Nunc F96) y por triplicados se colocaron 100µl ILKSe, ILKSG y CMS (partiendo con diluciones dobles seriadas). A continuación se aplicaron 100 µl de la suspensión que contenía a los blastos y se incubaron 48 horas a 37 C, en un ambiente con 5.0% CO₂. Agregando 1 µCi de Timidina marcada con tritio (Methyl-3H Dupont, Boston), por pozo, durante las últimas 24 horas de incubación. Posteriormente las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio (SKATRON instruments 11028 England.). En un contador de centelleo líquido (Beckman LS600SE, U.S.A.) se midió la incorporación de timidina (6, 10). Como testigo positivo se utilizó la línea celular de ratón CTLL2, dependiente de IL-2 para su proliferación. Se empleó como fuente de IL-2r el sobrenadante de la línea celular C63. Y como testigo negativo se utilizaron las células sin IL-2.

Bioensayo para la identificación de INF γ

Los esplenocitos de pollo se incubaron durante 24, 48, 72 y 120 hrs con los ILKSg e ILKSe en concentraciones del 10 y 20 % a 37 C en 5.0 % de CO₂. Al término del período de incubación, se cuantificó la expresión de moléculas clase I y clase II del CPH de la siguiente manera; 3 X 10⁵ células/ml. se colocaron en placas de cultivo celular de fondo redondo y se incubaron 30 minutos a 4 C en 100 μ l de sobrenantes ricos en los anticuerpos, F21-2 IgG de ratón anti-moléculas clase I del CPH (21), 2G11 IgG de ratón anti-moléculas II del CPH (11) y F21-21 IgG de ratón anti- β 2Microglobulina (21). Posteriormente se centrifugaron a 250 X g, 5 min a 4 C y el paquete celular se resuspendió en 200 μ l de PBS1 (Amortiguador de fosfatos-salino suplementado al 2% con SFB y 0.1% Azida). Este procedimiento se repitió dos veces. A continuación se incubó a 4 C 30 min en 100 μ l de IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Isotiocinato de Fluoresceína (Gibco BRL Goat antimouse IgG H+L Premium Quality fitc labeled). Al terminar el período de incubación se procedió a lavar dos veces con 200 μ l de PBS1 y se resuspendieron en 500 μ l de yoduro de propidio al 0.1%. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en citometría de flujo (FacSort) y los datos se analizaron por el software LYSIS II (Becton Dickinson)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis de Regresión. Dicho análisis fué utilizado para determinar la correlación entre las diluciones del sobrenadante SeILK, y la proliferación de blastos de pollo, como prueba indirecta para evaluar la presencia de IL-2. Mediante el paquete estadístico SAS (1990).

Análisis de Varianza. Fué utilizado para evaluar la expresión de moléculas clase I y II del CPH de pollo. Las diferencias entre medias fueron sometidas a la prueba de rango múltiple de Scheffe, utilizando los modelos generales lineares del paquete estadístico SAS (1990).

7.-RESULTADOS

I BIONEYAO PARA LA IDENTIFICACION DE IL-2

Mediante los ensayos de incorporación de timidina, se observó la proliferación de linfocitos T por la presencia de IL-2 en ILKSe, mostrando un punto óptimo de actividad biológica (proliferación) en la dilución 1:2 con 17 173 cpm; disminuyendo esta, conforme se bajo la concentración con el ILKSe; disminuyó la proliferación hasta llegar a la pérdida de dicha actividad en la dilución 1:256 con 2711 cpm. En el testigo negativo S/S (sin sobrenadante) se contaron 3, 238cpm.(Figura 4)

Mediante el análisis estadístico, se observó una correlación negativa significativa ($r =$; $P < 0.05$, $r = 0.64$) indicando que, a medida que la dilución del sobrenadante SeILK aumenta, la proliferación de blastos de pollo disminuye. (Figura 1).

En la figura 2 se demostró que la actividad biológica de ILKSe se consideró casi nula, ya que presenta una incorporación de timidina de 3, 362 cpm en la dilución 1:2 como punto máximo, siendo similar al resultado obtenido del testigo negativo S/S (sin sobrenadante) con 3,108 cpm . (Figura 4)

II: BARRERA DE ESPECIE DE LA ACTIVIDAD DE IL-2:

La barrera especie de la IL-2 de pollo, se observó cuando el sobrenadante ILKSe se empleó para mantener proliferando la línea celular de ratón CTLL-2, como podemos observar en la Figura 3, no se presentó incorporación de timidina en este caso ya que sus cuentas oscilan entre 60 y 120 cpm. Por que se puede pensar que al no existir un factor de proliferación que estimulara a las células, estas murieron. De manera semejante, la IL-2r de ratón (Sobrenadante de C63) no indujo proliferación en los blastos de pollo, consiguiendo sólo 2, 643 cpm (Figura 4), podemos demostrar que la falta de

proliferación de CTLL2 no se debió a un problema técnico, pues dicha línea celular proliferó eficientemente cuando se cultivó con IL-2r (Sn de C63) con una incorporación de timidina de 63 691cpm Figura 5.

III: Presencia de INF- γ

La actividad de INF γ en ILKSe e ILKSg fué detectada indirectamente por el aumento en la expresión de moléculas de clase I y clase II del CPH. En la Figura 6, se muestran los efectos de la inducción de moléculas clase I, en (A) por efecto de ILKSe, presentando un punto máximo de expresión a las 72 hrs, con un aumento de 41.29 veces el valor basal 12.03 (representado por la intensidad de fluorescencia emitida). Esta actividad decreció paulatinamente, hasta las 120 h, sin llegar a la pérdida de la función, ya que todavía fué 12.71 veces el valor inicial. El efecto producido por ILKSg (B), se comportó de manera similar al anterior con una máxima expresión también a las 72 h, y decayó sin llegar al valor basal a las 120 hrs. Se utilizó como testigo positivo, un cultivo mixto secundario (CMS); ya que se ha descrito con anterioridad que, cultivos celulares estimulados alogénicamente liberan grandes cantidades de INF γ . En este caso, también se observó un pico máximo de expresión a las 72 hrs, pero en este caso en todos los tiempos de incubación se observó un efecto de concentración.

Mediante el análisis estadístico se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Ver tabla I.

Al verificar el aumento de moléculas clase II (Figura7), los tres tratamientos mostraron su máxima expresión de manera contraria a lo demostrado anteriormente, a las 48 h, aumentando el valor basal (16.56) hasta 61.83 veces, e igualmente este disminuyó al aumentar el tiempo de incubación. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los (ILKSe, ILKSg) y sus

concentraciones de 10% y 20%. ($P < 0.05$), así como un efecto dosis respuesta en la expresión de moléculas clase I y II del CPH con CMS. Ver tabla 2.

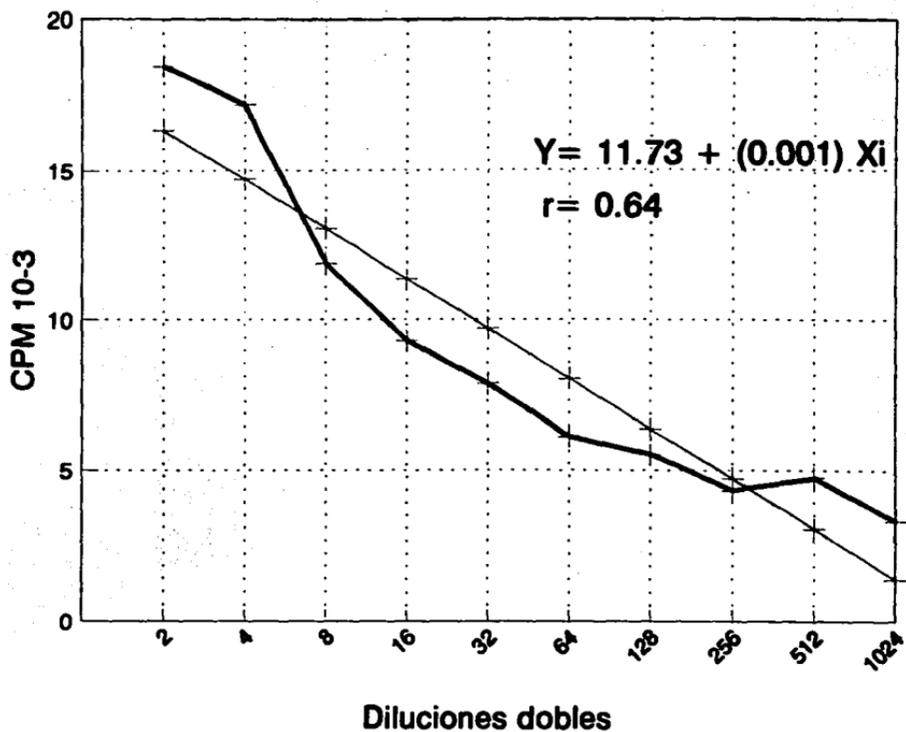


Figura 1. PROLIFERACION DE BLASTOS DE POLLO POR ILKSe

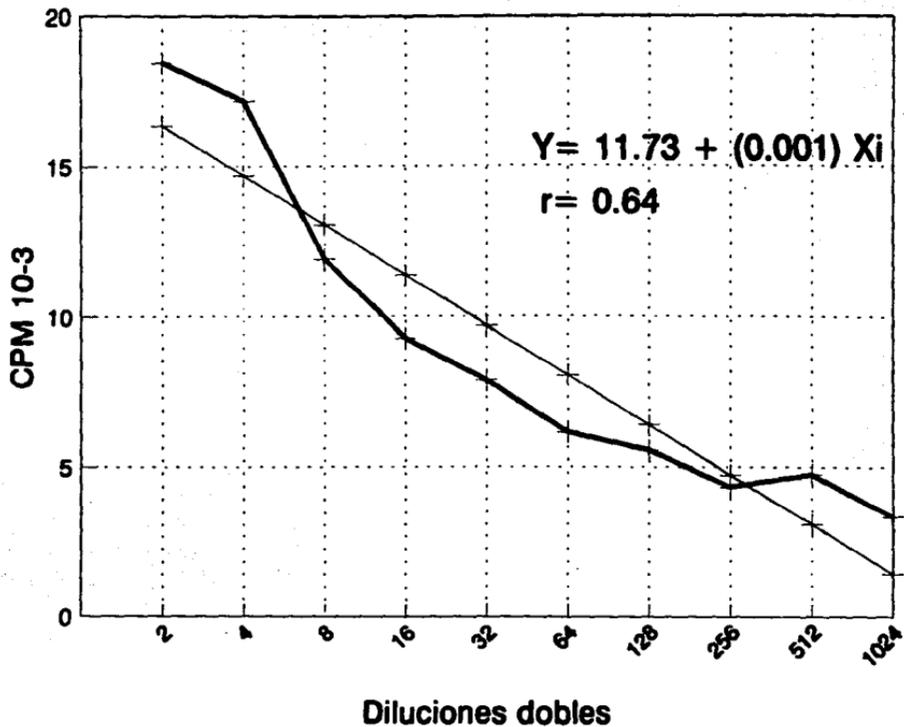


Figura 1. PROLIFERACION DE BLASTOS DE POLLO POR ILKSe

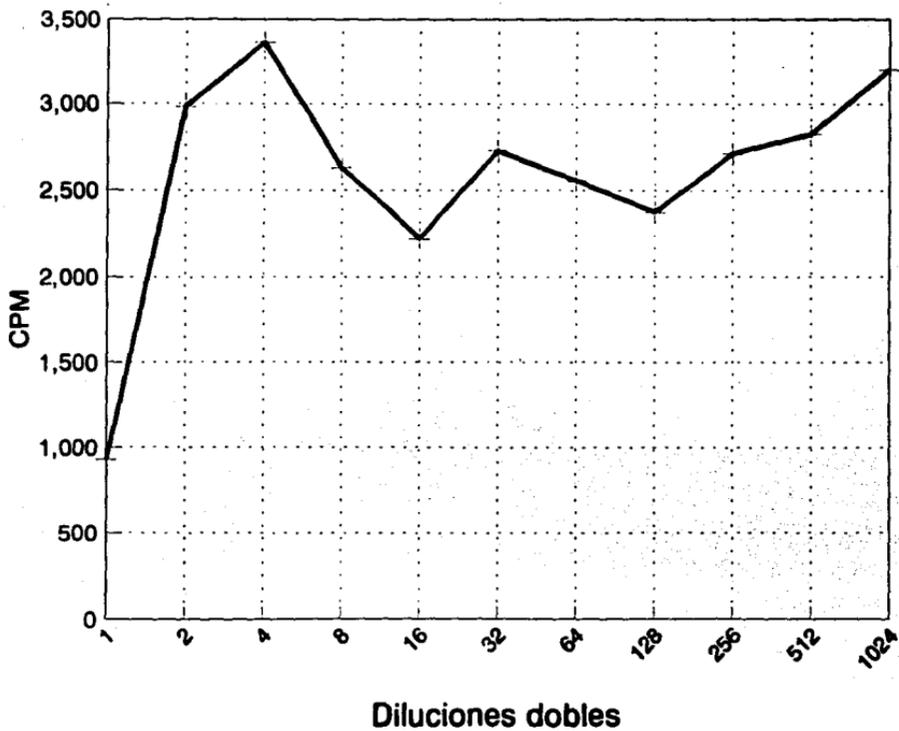


Figura 2. PROLIFERACION DE BLASTOS DE POLLO POR ILKSg

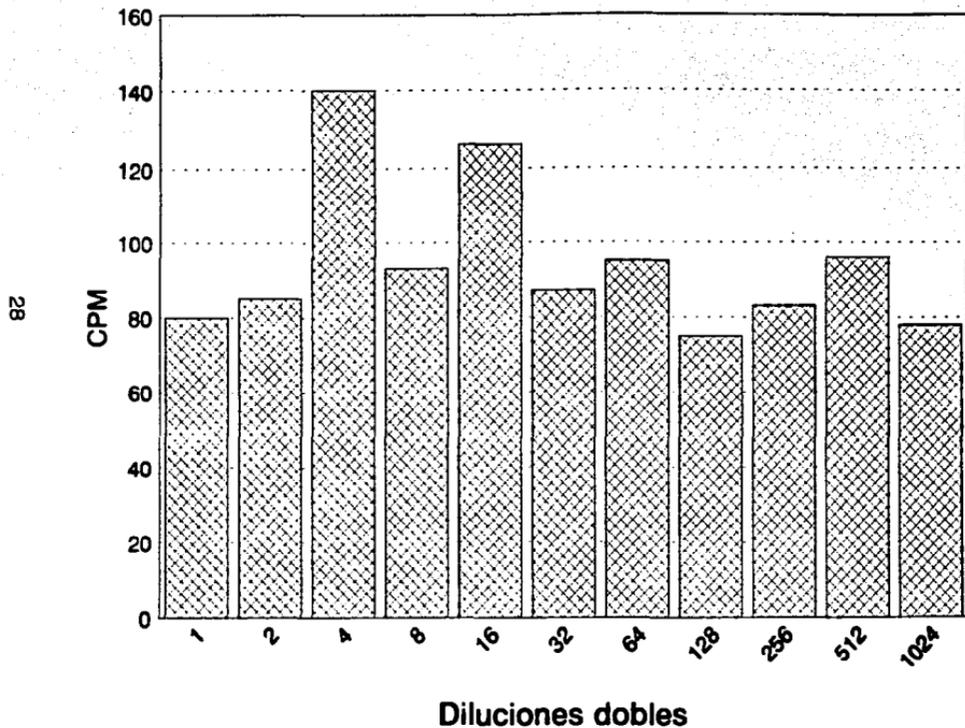


Figura 3. AUSENCIA DE PROLIFERACION DE LA LINEA CTLL-2 POR ILKSe

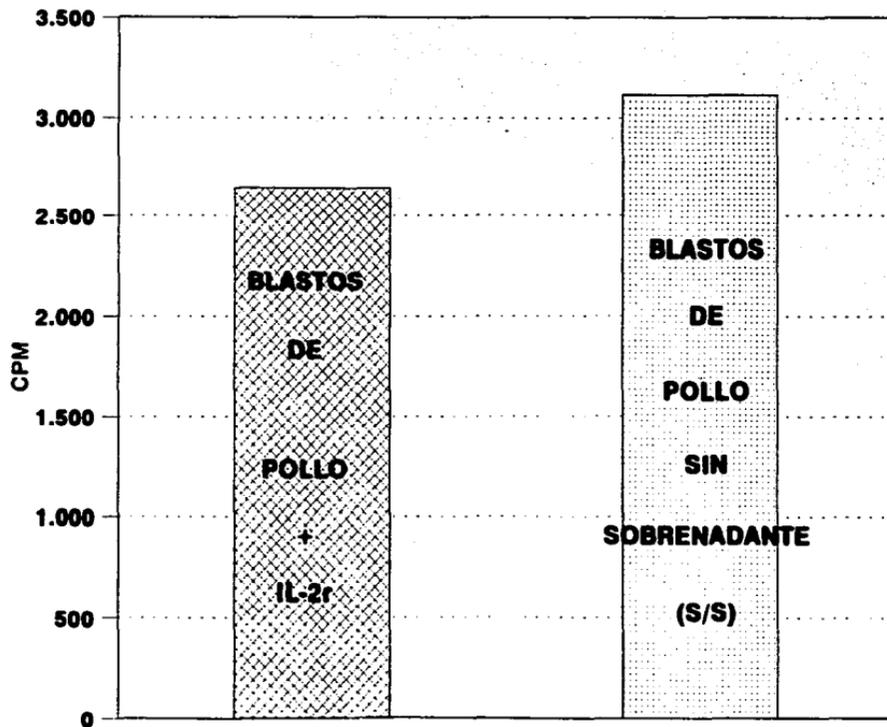


Figura 4. TESTIGOS NEGATIVOS

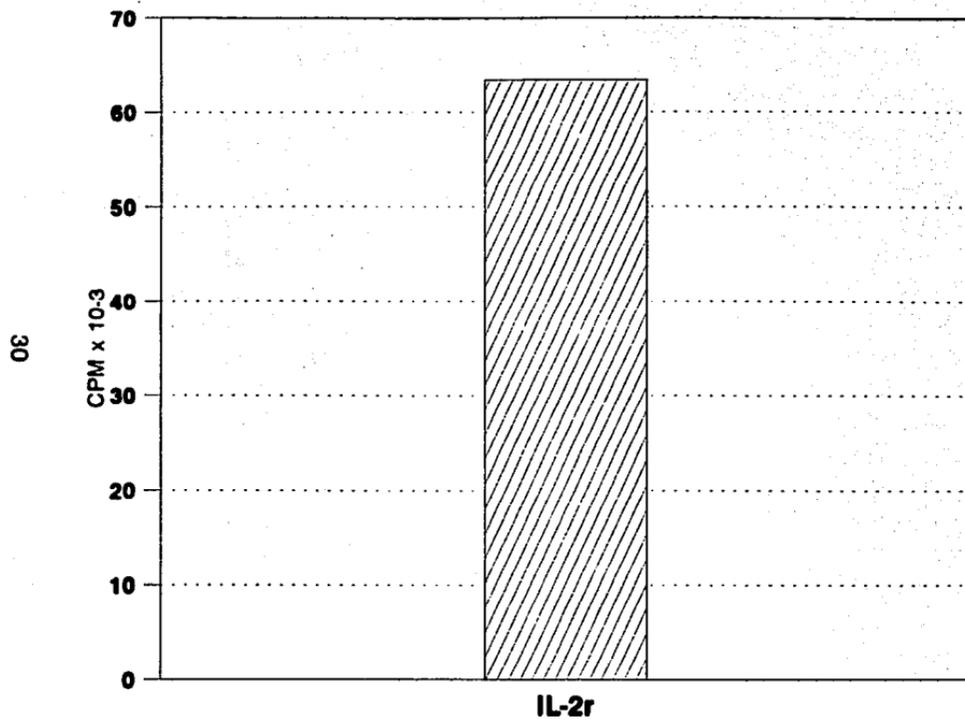


Figura 5. PROLIFERACION DE LA LINEA CTLL-2 CON IL-2r

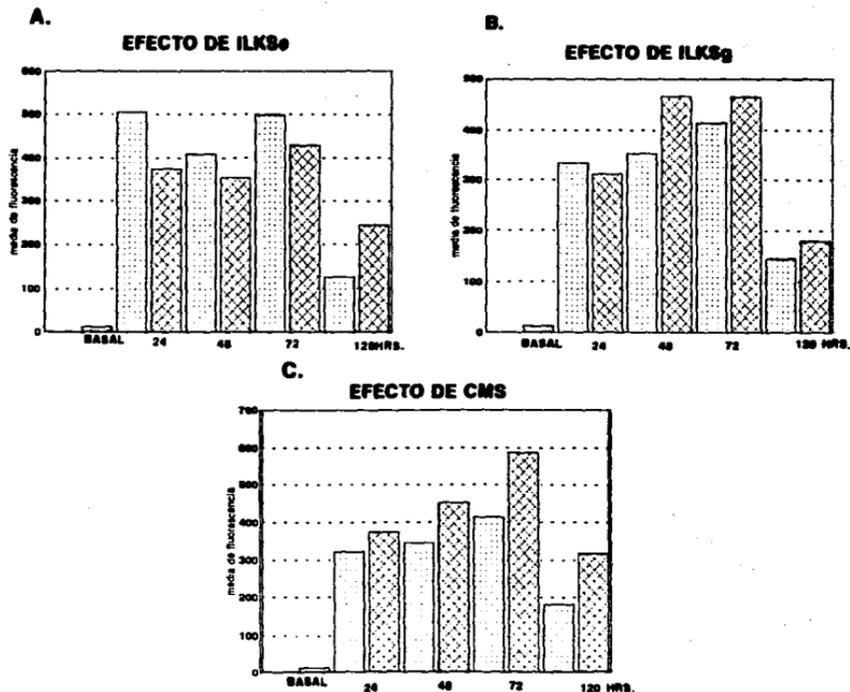
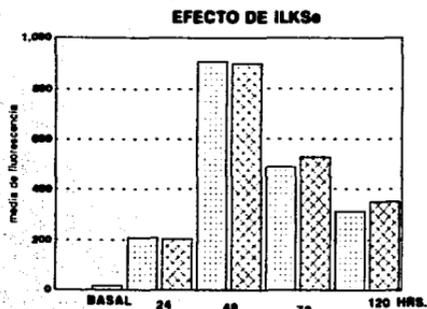


Figura 6. ACTIVIDAD DE INTERFERON-GAMA EN ILKS_e E ILKS_g.

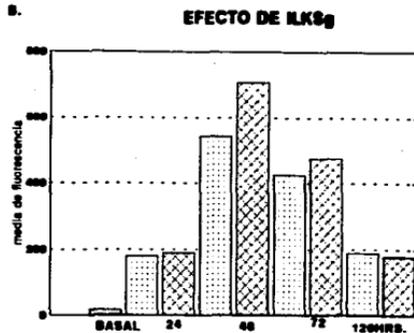
Una de las actividades de Interferon-gama fué detectada por la inducción en la expresion de moléculas clase I del CPH de pollo.

Las barras con puntos representan la concentración al 10% de ILKS_e e ILKS_g; y las barras con rombos la concentración al 20%.

A.



B.



32

C.

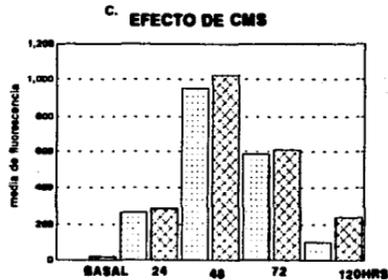


Figura 7. ACTIVIDAD DE INTERFERON-GAMA EN ILKS₀ E ILKS_g.

Se midió la inducción en la expresión de moléculas clase II del CPH de pollos, para detectar la presencia de interferon-gama.

Las barras con puntos representan ILKS₀ e ILKS_g en concentración al 10%, y al 20 % en las barras con rombos

INDUCCION DE MOLECULAS DE CLASE I EN ESPLENCITOS DE POLLO POR EFECTO DE ILKSe Y ILKSg.

Valor Basal	12.03 ± 0.05 ^I			
TRATAMIENTO	24	48	72	120 Hra
ILKSe 10%	504.31 ± 0.32 A	408.21 ± 0.26 D	498.82 ± 0.31 B	152.96 ± 0.19 G
ILKSe 20%	373.83 ± 0.18 E	358.33 ± 0.40 F	427.04 ± 2.63 C	126.94 ± 0.09 H
ILKSg 10%	333.02 ± 0.05 D	303.28 ± 0.38 F	413.65 ± 0.35 B	145.48 ± 0.60 H
ILKSg 20%	351.82 ± 0.21 C	320.40 ± 0.73 E	465.42 ± 0.45 A	179.47 ± 0.53 G
CMS 10%	321.19 ± 0.40 F	443.05 ± 0.07 E	414.93 ± 0.17 C	181.97 ± 0.08 H
CMS 20%	373.26 ± 0.48 D	454.34 ± 0.41 B	586.67 ± 0.53 A	317.58 ± 0.35 G

Tabla 1. Promedio y desviación estándar de los valores de ILKSe e ILKSg. Tratamientos con diferente literal, muestran diferencias estadísticamente significativas. P < 0.05.

INDUCCION DE MOLECULAS DE CLASE II EN ESPLENCITOS DE POLLO POR EFECTO DE ILKSe Y ILKSg.

Valor Basal	116.56 ± 0.06 ^I			
TRATAMIENTO	24	48	72	120 Hra
SeILK 10%	208.86 ± 0.86 ^G	899.00 ± 1.03 ^B	487.36 ± 6.82 ^D	312.96 ± 0.19 ^F
SeILK 20%	205.05 ± 0.73 ^G	906.40 ± 1.62 ^A	523.96 ± 0.07 ^C	349.43 ± 1.04 ^E
SgILK 10%	180.00 ± 0.35 ^D	543.41 ± 2.71 ^B	425.35 ± 0.62 ^D	188.71 ± 0.32 ^E
SgILK 20%	189.25 ± 0.52 ^E	709.95 ± 0.92 ^A	477.26 ± 0.28 ^C	177.61 ± 0.63 ^G
CMS 10%	267.03 ± 0.35 ^F	948.00 ± 0.15 ^B	586.67 ± 0.53 ^D	101.48 ± 0.61 ^H
CMS 20%	286.25 ± 0.28 ^D	1024 ± 0.53 ^A	609.36 ± 0.95 ^C	241.22 ± 0.52 ^G

Tabla II. Promedio y desviación estándar de los valores de ILKSe e ILKSg. Tratamientos con diferente literal, muestran diferencias estadísticamente significativas. (P < 0.05).

8.-DISCUSSION

Una Opción para contrarrestar el problema de la salmonelosis en aves explotadas comercialmente es la manipulación apropiada del sistema inmunocompetente (2). Al respecto, una posibilidad puede ser la utilización de interleucinas; las cuales actúan como mediadores solubles de la respuesta inmune específica e inespecífica, por lo que han sido utilizadas en tratamientos para algunas enfermedades de humanos y ratones, demostrando eficacia (2,4,10).

En trabajos anteriores se demuestra que el efecto del extracto crudo obtenido de linfocitos T: ILKSG e ILKSE, al ser administrado en aves, y posteriormente desafiadas con *Salmonella gallinarum* y *Salmonella enteritidis*, disminuyó significativamente en mortalidad y en invasión de órganos por la bacteria. En este trabajo se demostró la presencia de la IL-2 e INF γ en ILKSE e ILKSG. La IL-2 de acuerdo con lo reportado con Myers y col. (1992) posee un efecto de proliferación en linfoblastos de pollo, al igual que lo reportado en mamíferos. Al existir esta interleucina en el sobrenadante nos indica que pudiera ser la principal interleucina que produce la proliferación de células T en la respuesta inmune contra *Salmonella*. Sugiriendo que la protección biológica observada, podría deberse a la presencia de estas interleucinas.

En particular la presencia de INF γ en ILKSE e ILKSG es de gran importancia; ya que se ha demostrado en ratones y humanos, que es el activador más importante de macrófagos, induciendo la síntesis de enzimas que van a mediar el estallido respiratorio permitiendo a estos fagocitos profesionales eliminar a los microorganismos fagocitados. Por lo anterior se postula que en pollos pudiera inducir el mismo efecto. Desde que se describieron por primera vez los INFs en pollo (Isaacs and Lindenmann, 1957); se ha obtenido información muy limitada de estos, hasta 1994 Kaspers y col. demostraron la presencia de una molécula con funciones similares a las descritas por los INF γ murino y humano; como es,

inducir la expresión de moléculas clase II del CPH en macrófagos, estimulando la transcripción del gene. De acuerdo con lo descrito por Kaspers y col., el aumento en la expresión de moléculas clase II tiene un pico de expresión a las 48 h después de la activación, lo cuál concordó con los resultados obtenidos en este trabajo. En lo referente al aumento en la expresión de moléculas clase I por efecto de INF γ en pollos, se demostró que después de la activación llega a su máxima expresión a las 72 h .

Un hallazgo importante fué la presencia de moléculas clase I y clase II en linfocitos T de pollo; ya que sugiere que la presentación de antígeno, pudiera llevarse a cabo via CD4 y CD8. Al mismo tiempo los macrófagos activados secretarían IL-12. Interleucina directamente involucrada en la inducción de una respuesta de linfocitos Th1, los cuales son los responsables de la secreción de IL-2 e INF γ , traducida a una respuesta inmune celular.

Los efectos de la IL-2 e INF γ detectados en este trabajo sugieren que la respuesta inmune de las aves se desarrolla de manera similar a los mamíferos, con algunas características propias de especie.

Estudios para purificar e identificar los genes de las linfocinas efectoras en pollos, así como sus efectos protectores se encuentran en progreso.

9.-CONCLUSIONES

✓ Se detectó la presencia de IL-2 en SelLK, demostrando que probablemente presenta la misma actividad biológica que en mamíferos, es decir; como factor de proliferación de linfocitos T.

✓ Se detectó la presencia de INF γ , en SelLK y SgILK a través de del mismo efecto biológico ya observado y descrito en mamíferos, es decir; incrementa la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

✓ Se confirmó la barrera de especie entre mamíferos y aves por la actividad de estas dos interleucinas.

✓ Se detectó la presencia de moléculas de clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad en linfocitos T activados.

10.- LITERATURA CITADA.

- 1.-Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S.: Celular and molecular immunology. Second Ed. Saunders press., Philadelphia, U.S.A. 1993.
- 2.-Coligan, J.E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevack, E. M., Strober, W.: Current Protocols in Immunology. Vol.1. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. U.S.A. 1992.
- 3.-Farrar, J.J., Benjamin, W. R., Hliffker, M. L., Howard, H., Farrar, L. F., Fuller, J.: The biochemistry, biology, and role of interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunological Rev.*, 63: 130-166 (1982).
- 4.-Gast, K. R.: Aplicación de modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. Curso de Actualización sobre el Control y la Prevención de la Infección por *Salmonella enteritidis*. México, D. F., 1994., 1-7. ANECA. México, (1994).
- 5.-Gast, K. R.: Uso de un Modelo de Infección Experimental para Evaluar la Eficacia de las Bacterinas Emulsificadas en aceite para proteger a los pollos contra *Salmonella enteritidis*. Curso de Actualización sobre el Control y la Prevención de la Infección por *Salmonella enteritidis*. México, D. F., 1994., 1-7. ANECA. México, (1994).
- 6.-Gordon, R.F.: Enfermedades de las Aves. *El Manual Moderno*. México, D.F., 1980.
- 7.-Hassfurth, R. L., Canning, P. C., Geib, R. W.: Isolation and characterization of an interleukin-8-like peptide in the bovine species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42: 117-126 (1994).
- 8.-Hsu, H. S.: Pathogenesis and Immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.*, 53: 390-409 (1989).
- 9.-Kaspers, B., Lillehoj, H. S., Jenkins, M. C., and Pharr, G. T.: Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 44: 71-84 (1994).
- 10.-Kaplan, M.H., Dhar, A., Brown, T.R., Sundick, R.S.: Marek's disease virus-transformed chicken T-cell lines respond to lymphokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 34: 63-79 (1992).

- 11.-Kauffman, J., Skjodt, Salomonsen J., Simonsen, M., Pasquier, L., Parisot R., Riegert, P.:**MHC-like molecules in some nonmammalian vertebrates can be detected by cross-reactive xenoantsera. *J. Immunol.*, **144**: 2258-2272 (1990).
- 12.-Kogut, H. M.,McGruder, D. E.,Tellez I. G.:** Avances recientes en el uso de infocinas derivadas de células T en la profilaxis de la infección de *Salmonella* en pollos. XIX Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco., 1994.,120-124. ANECA. México, (1994).
- 13.-Kogut, H. M., McGruder, D. E., Hargis, B. M., Corrier, D. E.,Deloach, J. R.:** Characterization of the pattern of inflammatory cell influx in chicks following the intraperitoneal administration of live *Salmonella enteritidis* and *Salmonella enteritidis*- immune lymphokines., **74**: 8-17 (1995).
- 14.-Krömer, G. Schauenstein, K., Wick, G.:**Avian lymphokines: an improved method for chicken IL-2 production and assay. A Con A-erythrocyte complex induces higher T cell proliferation and IL-2 production than does free mitogen. *J. Immunol. Methods.*, **73**: 273-281 (1984).
- 15.-McGruder, D. E., Ray, P. M., Tellez I. G. Kogut, H. M.,Corrier, D. E., Deloach, J. R., Hargis, B. M.:** *Salmonella enteritidis* (SE) leucocyte-stimulated soluble factors:effects on increased resistance to *Salmonella* organ invasion in day old Leghorn chicks. *Poultry Science.*, **72**: 2264-2271 (1993).
- 16.-McGruder, D. E., Ramirez, G. A., Kogut, H. M., Moore, R. W., Corrier, D. E., Deloach, J. R., Hargis, B. M.:** *In Ovo* administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella enteritidis* organ infectivity. *Poultry Science.*, **74**: 18-25. (1995).
- 17.-Myers, T. J., Lillehoj, H.S., Fetterer, R. H.:**Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*,**34**: 97-114 (1992).
- 18.-Paul, W. E.:**Fundamental Immunology.Third Ed. *Raven press Ltd.*, New York, U.S.A.,1993.
- 19.-Reek, G. N., Joseph, W., Becker, W., Cunningham, B. A.,Gunther, G. R.,Wang, J. L.Edelman, G. M.:** Relationships between the structure and activities of Concanavalina A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* , **234**: 369-382 (1974).
- 20.-Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.:** Immunology.Third Ed. *Mosby press.* Hong Kong.,1993.

- 21.-Salomonsen J., Skjold, K., Crone, M., Simonsen, M.:The chicken erythrocyte-specific MHC antigen. Characterization and purification of the B-G antigen by monoclonal antibodies. *Immunogenetics.*, 25:373-382 (1987).
- 22.-Sambhara, S. R., Belden, E. L.:Bovine interleukin 2: Production and characterization. *Vet. Immunol. Immunopathol.*,18: 165-172 (1988).
- 23.-Sharma, J. M.:Avances recientes en la inmunología aviar y la inmunomodulación. XIX Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco., 1994.,297-300. ANECA. México, (1994).
- 24.-Silva, E. N., Snoeyenbos, G. H., Weinack, O. M.,Smycer, C. F.:Studies on the use of 9R strain of *Salmonella gallinarum* as vaccine in chickens. *Avian Diseases.* 25: 38-52 (1980).
- 25.-Tellez, I. G., Kogut, H., Hargis, B.:Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn chicks . *Avian Disease.*, 37: 1062-1070 (1993).
- 26.-Weller, H., Bülow, V. V.: Development of optimal conditions for lymphokine production by chicken lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*,14: 247-257 (1987).
- 27.-Wong, R. A., Tellez, I. G., Isibasi, A., Ortiz, N. V.,Kogut, H. M., McGruder, D. E., Hargis, B. M.:Evaluación de linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunoprofilaxis contra la infección de *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda. XIX Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta, Jalisco., 1994.,375-377. ANECA. México, (1994).

11.-GLOSARIO

Alogénica. Variación genética entre especie.

β_2 -microglobulina. Polipéptido que constituye parte de algunas proteínas de membrana de las moléculas de clase I del CPH.

Citocinas. Nombre genérico de moléculas solubles, las cuales median interacciones entre las células.

Concanavalina A. Agente mitógeno de células T.

Complejo Principal de Histocompatibilidad. Región genética, cuyos productos son principalmente responsables del rápido rechazo a injertos entre individuos y también funciona emitiendo señales entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno.

Fagocitosis. Proceso por el cual las células engolfan material, engolfándolo dentro de una vacuola (fagosoma) en el citoplasma.

Interferones. Grupo de mediadores, que aumenta la resistencia de las células a infecciones virales, y actúan como citocina. $INF\gamma$ es también un importante mediador inmunológico.

Interleucinas. Grupo de moléculas involucradas en la señalización entre las células del sistema inmune.

Marcadores CD. Moléculas de superficie de leucocitos y plaquetas que son identificadas con anticuerpos monoclonales, utilizados para diferenciar poblaciones celulares.

Mitógeno. Sustancia que actúa en las células, particularmente en los linfocitos, desencadenando división celular.

NK (natural killer). Grupo de linfocitos que poseen la habilidad intrínseca de reconocer y destruir algunas células infectadas viralmente o células tumorales.

Linfocinas. Nombre genérico de moléculas involucradas en la señalización entre células del sistema inmune y son producidas por los linfocitos.

TH1. Población de linfocitos con determinado patrón de liberación de citocinas.