

01674
5



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**AMPLIFICACION DEL GEN DE IL-2 DE ESPLENOCITOS
TOTALES DE POLLO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE PRODUCCION
Y SALUD ANIMAL**

PRESENTADA POR

MVZ LILIA CASTELLANOS NOVOA

298739

COMITE TUTORAL:

Ph. D. GUILLERMO TELLEZ I.
DRA. GLADYS FRAGOSO
DR. VICTOR TENORIO G.
Ph D. BILLY HARGIS
DR. ROGELIO ALONSO



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DECLARACION

El autor da conocimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que este ejemplar de Tesis, esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ATENTAMENTE



MVZ Lilia Castellanos Novoa.

DEDICATORIAS

A Dios por haber entrado en mi corazón y transformado mi vida .

A mi papá Adalberto F. Castellanos P.

A mi mamá Lilia Novoa de Castellanos

A mi hermana Luz

Por todo su amor y por el apoyo principalmente para hacer la maestría.

A mi enano Tony y mi Tío Toño

A mis abuelitos.

A mis amigos que formaron parte de este trabajo siendo un insuperable equipo Nestor, Daniel,
Gonzalo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que sigue siendo la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Departamento de Producción Animal: Aves por haberme permitido ser formada en él y ser parte de él por 5 años.

A CONACYT y al financiamiento del laboratorio de investigación del Departamento de Producción Animal Aves con los proyectos del Dr. Gary García E.

Al Dr. Guillermo Téllez Isaías por darme tantas oportunidades para desarrollarme, la confianza, por su apoyo abriéndome todas las puertas y permitirme haber sido parte de un excelente equipo de trabajo con un nivel de Investigación de primera.

A mi comité tutorial Dr. Victor Tenorio G, Dra. Gladys Fragoso, Dr. Billy Hargis y Dr. Rogelio Alonso gracias por el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Dr. Gary García gracias por enseñarme a pescar y no darme los peces en las manos, gracias por mostrarme el camino para ser lo que soy y puedo ser.

A la Universidad e Texas A & M, al Dr. David Caldwell y su equipo gracias por darme la oportunidad de trabajar con su equipo, fué una experiencia inolvidable que jamás olvidaré.

Al Dr. Nestor Ledesma porque estuvo apoyándome en todos sentidos con este trabajo, gracias por las alas estoy volando.

A Daniel Ortega A. gracias por ser mi amigo, por tus oraciones y porque a través de ti recibí a Jesús en mi corazón.

A mis amigas Mony y Mireya se que realmente tengo en quienes confiar. A Gonzálo gracias por ser mi amigo y no olvidarte de mí.

A mis amigos y maestros del Departamento de Aves.

A mis amigos de IASA Dr. Joaquín Chapa, Dr. Eduardo Lucio, Tonatihu, Iris, Angeles, Victor Hugo, Manuel, Aida y a todos aquellos que me abrieron las puertas en Tehuacán.

A mis amigos de Boehringer Ingelheim gracias por su apoyo y amistad.

Gracias a todos los que siempre tuvieron una sonrisa para mí y a los que me tendieron la mano, de nombrar a todos no serían suficientes 100 hojas.

**AMPLIFICACION DEL GEN DE IL-2 DE ESPLENOCITOS TOTALES
DE POLLO.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado e Investigación
de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del grado de

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y SALUD ANIMAL.

Por el
MVZ Lilia Castellanos Novoa.

2001

COMITÉ TUTORAL

Ph. D. Guillermo Téllez Isaías.

Dra. Gladys Fragoso.

Dr. Victor Tenorio G.

Ph.D. Billy Hargis.

Dr. Rogelio Alonso.

RESUMEN

LILIA CASTELLANOS NOVOA: AMPLIFICACION DEL GEN IL-2 DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO. Comité Tutoral: Ph. D. Guillermo Téllez Isaías. Dra. Gladys Fragoso. Dr. Victor Tenorio G. Ph.D. Billy Hargis.

Siendo la IL-2 una citocina producida por los linfocitos T CD4+ CD8- una de las moléculas centrales de la respuesta inmune celular y sabiendo que se ha demostrado que las citocinas que se expresan por una infección de *Salmonella* corresponden a la producción de Interferón γ e IL-2 producidas por linfocitos T, se buscó la amplificación de este gen en pollos neonatos desafiados con *Salmonella gallinarum*; considerando la importancia que tiene este patógeno a nivel mundial siendo un patógeno intracelular, y que los pollos adquieren resistencia natural a la enfermedad después de los 7 primeros días de edad. Para poder lograr este objetivo, se estableció la técnica de RT-PCR para la amplificación del RNAm de CD3 a partir de bazo y la amplificación del RNAm de IL-2 de esplenocitos totales estimulados con Concanavalina A. Se monitoreó la expresión del gen de IL-2, teniendo como control la amplificación del gen de CD3 siendo esta molécula un complejo de proteínas asociadas con el Receptor de antígeno de las células T, el cual al ser amplificado sugirió una transcripción alternativa, indicándonoslo así la PCR interna y el corte por enzima de restricción. La amplificación del gen de IL-2 se realizó a partir de esplenocitos totales de pollo activados con Concanavalina A a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. siendo después verificada por corte de enzimas de restricción, por PCR interna y secuenciación. Se evaluó la expresión del RNAm de IL-2 en pollo neonato desafiado con 1×10^8 ufc de *Salmonella gallinarum* a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 postdesafío. La amplificación del RNAm de IL-2 no se observó por RT-PCR durante los 10 días postinoculación en los pollos neonatos desafiados con *Salmonella gallinarum* ni en los del grupo control, sin embargo la amplificación de este gen por PCR interna se observó desde el primer día postinoculación tanto en pollos desafiados, como en los controles, del mismo modo se observó la amplificación del gen, CD3 por RT-PCR desde el primer día en ambos grupos. La amplificación del RNAm de IL-2 obtenida a partir de los esplenocitos de las aves B300 es 95.7% homóloga a la secuencia obtenida por Kaiser P y Mariani P en 1999. No se encontró evidencia de que la IL-2 sea la citocina principal en la respuesta inmune a *Salmonella gallinarum* en pollos neonatos.

ABSTRACT

LILIA CASTELLANOS NOVOA: IL-2 GENE AMPLIFICATION FROM CHICKEN SPLEEN CELLS. Comité Tutorial: Ph. D. Guillermo Téllez Isaías. Dra. Gladys Fragoso. Dr. Victor Tenorio G. Ph.D. Billy Hargis.

The IL-2 is produced by CD4+CD8+ T cells, and is considered one of the central molecule in the celular immune response and it has been demonstrated that the main cytokines expressed by T cells in *Salmonella* infection are INF γ and IL-2. We amplified IL-2 gen en neonatal chicks challenged with *Salmonella gallinarum*, considering that this intracellular pathogen has worldwild importance and the chickens has natural resistance after 7 days old. To obtain this objective the gen expression by RT-PCR technique was developed, using for control the amplification of CD3 gen from spleen cells, and the amplification of IL-2 from spleen cells activated with Concanavaline A. This IL-2 gene expression was made with CD3 control, being this molecule a protein complex associated with the T cells antigenic receptor, wich one suggested an alternative splicing by the Nested PCR amplification and restriction enzyme cut results. The IL-2 gene amplification was made from chicken spleen cells activated with Concanavaline A using 10 μ g/ml concentration. And this amplification was verified by restriction enzymes, Nested PCR and secuenciación. The IL-2 RNAm expression was evaluated in neonatal chicks challenged with 1 X10⁸ ufc of *Salmonella gallinarum* at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 10 days postchallenge. The IL-2 RNAm amplification was not observed at any day by RT-PCR in neonatal chicks. We observed the amplification of this by Nested PCR since the first day postinoculation in control and challenged chicks. We observed also the CD3 gen amplification by RT-PCR since the first day . The IL-2 RNAm amplification obtained from spleen cells from B300 es 95.7% homologous to published by Kaiser p and Mariani P in 1999. There was not evidency that the IL-2 is the main citokine ne the immune response to *Salmonella gallinarum* in neonatal chicks.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|-------------------------------|------------|
| Resumen | I |
| Abstract | II |
| Tabla de contenido | III |
| Lista de figuras | IV |
| Lista de abreviaturas | V |
| Introducción | 1 |
| Justificación | 6 |
| Objetivo genral | 9 |
| Objetivos particulares | 9 |
| Hipotesis | 9 |
| Material y métodos | 10 |
| Resultados | 17 |
| Discusión | 25 |
| Conclusiones | 29 |
| Literatura citada | 30 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Modelo formado entre la IL-2 y su receptor.

Figura 2.- Gel de agarosa con Bromuro de etidio de la amplificación del RNAm de CD3 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales.

Figura 3.- Comparación de la secuencia promotora de CD3 de pollo amplificada a partir de esplenocitos totales de pollo con la publicada por Bernot A y Auffray C.

Figura 4.- Gel de agarosa con Bromuro de etidio de la amplificación de RNAm de IL2 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales de pollo.

Figura 5.- Comparación de la secuencia promotora de IL-2 de pollo amplificada a partir de esplenocitos totales de pollo con la publicada por Kaiser P y Mariani P.

Figura 6.- Gel de agarosa con Bromuro de etidio de la amplificación del RNAm de CD3 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos de pollo.

Figura 7.- Gel de agarosa con Bromuro de etidio de la amplificación del RNAm de IL-2 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| CD | Determinante antigénico |
| NK | Asesinas Naturales |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferon |
| KDa | Kilo Daltons |
| HBSS | Solución Salina sBalanceada de Hank |
| PBS | Solución Fosfatada Bufferada |
| DEPC | Dietil Pirocarbonato |
| dNTP | Deoxinucleótidos |
| DNA | Acido Desoxirribonucleico |
| cDNA | Acido Desoxirribonucleico complementario |
| RNA | Acido Ribonucleico |
| RNAm | Acido Ribonucleico mensajero |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| RT-PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa |

I.- TITULO:

Amplificación del gen IL-2 de esplenocitos totales de pollo.

II.- INTRODUCCION:

2.1 SALMONELOSIS EN POLLOS

La salmonelosis es una enfermedad causada por las diferentes especies de *Salmonella* y tiene manifestaciones clínicas severas, que van desde una gastroenteritis y hasta bacteremia. Tiene importancia mundial significativa tanto económica y de salud pública. Las diferentes especies de *Salmonella* son organismos que pueden ser usados para investigar los complejos que interactúan entre el patógeno y el huésped, tanto *in vivo* como *in vitro*.¹

Es un patógeno intracelular, Gram-negativo, capaz de infectar una variedad de huéspedes. Después de la ingestión oral, la bacteria penetra en el epitelio del intestino delgado.² Mientras la patogénesis de la salmonelosis está bien definida en los modelos mamíferos como el ratón y el conejo, hay sorpresivamente una cantidad limitada de literatura describiendo la patogénesis de esta enfermedad en el modelo aviar. La respuesta inmune comienza con la interacción entre el patógeno y las células epiteliales produciéndose la quimiotaxis de las células fagocíticas al lugar de la infección, esta respuesta celular se da tanto por la migración de los heterófilos como de los macrófagos a la superficie luminal. Estudios previos han demostrado que los macrófagos juegan un papel de diseminación de la *Salmonella* a los órganos del sistema reticuloendotelial, tanto a los linfonodos mesentéricos, como hígado y bazo.² La *Salmonella* penetra al epitelio intestinal, esta penetración está mediada por el sistema de secreción tipo III codificada en la Isla de patogenicidad I de *Salmonella*. Las proteínas secretadas por este sistema interactúan con las células epiteliales activando diferentes respuestas incluyendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, permitiendo la llegada de células polimorfonucleares acompañadas por un aumento en la secreción de fluidos.³ Los linfocitos T alojados primero en el Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa migra tanto a la mucosa como a la lámina propia, para participar en la defensa, siendo principalmente Linfocitos T CD4+, o al epitelio tanto CD8+ α/β o CD4+ intraepitelialmente.⁴ Se ha demostrado que las aves mostraron aumento de resistencia a la invasión por *Salmonella* después de haberseles administrado parenteralmente sobrenadante rico en citocinas obtenidas de células T estimuladas con Concanavalina A.⁵

2.2 CITOCINAS

Los linfocitos T son las células centrales de la regulación del sistema inmune; sus funciones están mediadas por moléculas solubles designadas citocinas, por receptores de membrana. Las citocinas actúan uniéndose a receptores de alta afinidad expresadas en las células blanco. La IL-2 está incluida en el grupo de las hematopoyetinas las cuales comparten características estructurales de sus receptores⁶.

2.3 INTERLEUCINA-2

La IL-2 es una citocina producida por los linfocitos T después de una estimulación antigénica de estos, siendo un factor de crecimiento autócrino y parácrino; media la expansión clonal de los linfocitos CD4⁺ CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, así como de las células asesinas naturales (NK) y de los linfocitos B. Formalmente es conocida como Factor de crecimiento de las células T y actualmente se le reconoce como una de las moléculas centrales de la respuesta inmune celular, permitiendo la inmunidad específica y no específica hacia agentes microbianos y tumorales⁷.

Fue descubierta en 1976 por Morgan et al., debido a su propiedad de aumentar la mitogénesis de los linfocitos T humanos y mantener el crecimiento continuo de las células T normales en cultivo⁸.

La expresión y secreción de la IL-2 es inducida por una combinación de estímulos inmunes dados por la interacción del receptor antigénico de las células T con un antígeno específico asociado al Complejo Mayor de Histocompatibilidad, así como por señales accesorias dadas por células presentadoras de antígeno como son los factores solubles⁹.

2.3.1 Características

Es una proteína globular constituida por cuatro hélices α que se sitúan formando caras planares hidrófobas alrededor de una porción central muy hidrófoba y dos asas β ⁸. Esta configuración se mantiene, en parte por un enlace disulfuro simple entre las cadenas, que es esencial para su actividad biológica. Su peso molecular es de 13 a 29 kDa y su punto isoeléctrico es de 5.^{8,10} Myers T.J et al., en 1992 realizaron una purificación parcial y caracterización de la IL-2 de pollo, encontrando un rango de peso molecular que va de 17.5 a 25 kDa.⁷ (Fig. 1)

2.3.2 Características moleculares

La IL-2 madura contiene un péptido señal que no tiene sitios de glicosilación y puentes disulfuro que parecen cruciales para su función¹¹. La similitud de la secuencia de los aminoácidos comparados entre el humano, el pollo y ratón sugieren que la molécula del pollo tiene una similitud estructural con sus homólogos¹¹. Hay 4 regiones repetidas con aminoácidos hidrofóbicos en la posición 1 y 4 los cuales forman presumiblemente las α -hélices anfipáticas. Estas regiones son equivalentes a las hélices A, B, C y D de los mamíferos¹¹. El gen de IL-2 está compuesto por cuatro exones y tres intrones correspondiendo exactamente al de los mamíferos excepto por que el exon 2 y el intrón 2 son más pequeños. De los tres intrones, el primero es más grande que el equivalente de mamífero; el segundo y el tercero son más pequeños, principalmente el tercero. El gen se encuentra en el cromosoma 4 unido al ANX5 al igual que el del cromosoma humano 4 y 3 del ratón. Los experimentos de mapeo también muestran que el gen de la IL-2 de pollos es de copia sencilla al igual que el de los mamíferos¹¹.

2.3.3 Transcripción:

El ARNm, no es sintetizado constitutivamente en los linfocitos T, la transcripción de la IL-2 está restringida a las células T y es fisiológicamente dependiente de estímulos específicos tales como el reconocimiento antigénico; en general los niveles máximos de ARNm para IL-2 se han registrado de las 4 a las 8 horas después de la exposición de las células al estímulo^{12,13,14}. Se piensa que solamente el IL-2R β media la señal de transducción¹⁵. La mayoría de los sitios de unión de los factores de transcripción identificados en promotores del humano y del ratón están presentes en el promotor de IL-2 de pollo, siendo muy similares en sus equivalentes en la secuencia y están presentes en el mismo orden en el promotor¹¹.

-

2.3.4 Receptores

El receptor de la IL-2 está constituido por 3 cadenas complejas que son proteínas integrales de la membrana que se relacionan entre sí de modo no covalente, de las cuales la cadena α es única para la IL-2, la cadena β es compartida como receptor de la IL-15 y la cadena γ es compartida como receptor de las IL-4, -7-9 y -15¹⁶. Las variaciones en el amino terminal determinan la

afinidad de la unión con la IL-2. La subsecuente interacción de la IL-2 con los receptores de alta afinidad promueve la rápida expansión clonal de la población de las células T originalmente activadas por antígenos⁸. La expresión de los receptores de la IL-2 está regulada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales¹⁷. Su expresión declina alrededor de 6 a 10 días posteriores a la activación, independientemente de que haya IL-2 presente regulándose de manera autónoma; por lo tanto unos cuantos días después de la activación la célula T se volverá refractaria a IL-2 cesando la proliferación clonal. Esta naturaleza transitoria ayuda a mantener el patrón cíclico y autolimitante del crecimiento normal de la célula T *in vivo*. Se ha identificado una proteína G que se une al receptor, inducida en las células T activadas por IL-2; implicada en la proliferación de dichas células¹⁸.

Las células asesinas naturales (NK), al igual que las células T en reposo, expresan constitutivamente la cadena β y γ de IL-2, y pueden ser estimulados por niveles altos de IL-2. Sin embargo las células NK, no expresan IL-2 R α y, por lo tanto no reducen sus requerimientos de IL-2 incluso tras la activación como en el caso de las células T. Las células NK proliferan sólo en respuesta a concentraciones más altas de IL-2. La célula T una vez estimulada comienza a expresar la cadena IL-2R α y de este modo adquieren receptores de alta afinidad⁸.

Los linfocitos B activados expresan IL-2R de alta afinidad en aproximadamente el 30% de la densidad que se encuentra en células T activadas⁸. Los monocitos y macrófagos expresan de manera constitutiva cantidades bajas de cadena IL-2R β , pero expresan por inducción receptores de alta afinidad que contienen las tres cadenas al exponerse a IL-2 u otras sustancias activantes⁸.

2.3.5 Funciones biológicas

Las células T estimuladas por IL-2 muestran un aumento en la intensidad de las respuestas inmunitarias mediadas por estas células y puede actuar como factor de muerte para ellas mismas.

Estimula la síntesis de otras linfocinas producidas por estas células como el INF γ .

Actúa como factor de crecimiento de las células B y como estímulo de la síntesis de anticuerpos.¹⁹

Como factor de crecimiento promueve la proliferación y diferenciación de cualquier célula que exprese alta afinidad al receptor IL-2.

De manera indirecta la IL-2 estimula la producción del factor de estimulación granulocítica-macrófaga, que regulan las actividades de macrófagos y la exposición continua de un macrófago activado a IL-2 aumenta sus actividades.^{8, 20, 21}

En las células NK estimuladas por IL-2 se promueve su maduración en la expresión de su función citotóxica y el aumento de esta.^{20, 21}

2.4 CD3.

Aunque la unión del Receptor de Células T (TCR) a el complejo mayor de Histocompatibilidad unido a la célula presentadora de antígeno, es necesario para iniciar su activación, la coestimulación adicional de los receptores de la superficie celular se requieren para una óptima proliferación, la producción de citocinas y la citotoxicidad. Más aún, se ha demostrado que las señales vía complejo TCR/CD3 puede inducir anergia fin d²².

El CD3 es un complejo de multisubunidades de proteínas no covalentemente asociadas con el Receptor de Antígeno de las células T. Considerables evidencias indican el papel de la molécula CD3 en la transducción de la señal de activación de la célula T²³.

Las moléculas de CD3 incluyen a miembros de la superfamilia de las Ig de alta homología llamados γ , δ y ϵ . Además del 80 al 90 por 100 de los complejos contienen un homodímero unido por puentes disulfuro de una proteína denominada cadena ζ . En los ratones se ha reportado que las células T expresan un heterodímero de la cadena ζ y un producto del procesamiento alternativo de su gen denominado cadena η . Cuando un antígeno se une al TCR, las cadenas asociadas CD3 transducen señales al citoplasma de la célula que conducen a su activación funcional. Una vez reconocido el complejo péptido – Complejo Mayor de Histocompatibilidad se fosforilan los residuos de tirosina de los Motivos de activación del inmunorreceptor vía tirosina (ITAM). En las colas citoplasmáticas de las cadenas de CD3. Otra función es facilitar la expresión en superficie del complejo TCR.²⁷

En ratones el gen de CD3 γ está constituido por siete exones, y es altamente homólogo al gen CD3 δ , y sus transcripciones parecen ser controladas por los mismos elementos regulatorios²⁴.

En aves se demostró que los timocitos que expresaron en su superficie el CD3 fueron predominantemente linfocitos T CD4+ y CD8+, que se ha encontrado la molécula de CD3 citoplásmica en esplenocitos al octavo día embrionario²⁵.

La transcripción del RNAm del CD3 fue detectada desde el décimo día embrionario y su señal aumenta hasta después del nacimiento²⁶, sin embargo Pat Bucy reportó la presencia de CD3+ citoplásmico en esplenocitos desde el día 8 embrionario.²⁷

Tomando en cuenta los datos antes mencionados, la amplificación del gen de CD3 nos permitió evidenciar la presencia de los linfocitos CD4+, siendo el control en la producción del RNAm y su amplificación demostrando que el proceso de extracción de RNAm y RT-PCR fueron obtenidos a partir de estas células ya sea dando resultados positivos o negativos en la producción de IL-2.

2.5 JUSTIFICACION.

Se conoce muy poco de la inmunidad celular y humoral en las aves en contra de diferentes patógenos, debido a la falta de herramientas que permitan evaluar y analizar los fenómenos biológicos de la respuesta inmune del pollo. La interacción de las especies de *Salmonella* con el sistema inmune son numerosas y complejas. El uso de cultivos celulares ha dejado datos a veces contradictorios acerca de la inducción de citocinas. Para definir los eventos complejos que ocurren en el sistema inmune después de una infección con *Salmonella* se requerirá una tecnología más sofisticada tal como la PCR para demostrar la formación de citocinas¹.

Los ratones han sido usados como modelo para infección de *Salmonella*. Se han encontrado cepas de ratones como *Mus mus. Castaneus*, *Mus mus musculus*, *Mus mus molosinus*, *Mus domesticus complex*, *Mus mus domesticae* *Poschiavinus* con características específicas en la IL-2 relacionadas como respuestas²⁸. Del mismo modo se han realizado estudios para buscar diferencias moleculares en la IL-2 de diferentes líneas de pollo para encontrar alguna relación entre la susceptibilidad de estas líneas para algunas enfermedades, sin encontrar diferencias entre ellas¹¹.

Las especies de *Salmonella* infectan tanto células fagocíticas y no fagocíticas. Se ha demostrado por diferentes estudios que la disminución de células CD8+ o CD4+ aboga completamente la transferencia de la inmunidad de protección. Colectivamente estos estudios indican que las células CD4+ y CD8+ actúan de manera sinérgica para controlar la infección en especies virulentas de *Salmonella*²⁹.

Se ha demostrado en mamíferos que las citocinas que se expresan por una infección de *Salmonella* corresponden a la producción de IFN γ e IL-2 producidas por los linfocitos T³⁰.

Se necesita un mayor entendimiento de como la *Salmonella* interactúa con el huésped, para entender la enfermedad y los procesos de colonización en el pollo, ambos en términos de la salud animal y pública. Los logros recientes en la clonación de citocinas aviares permite el desarrollo de técnicas moleculares para evaluar la producción de citocinas en respuesta a la infección en el pollo y puede permitir una mayor profundidad en el conocimiento de la interacción entre el huésped y la *Salmonella* a nivel molecular y celular³.

Las diferentes especies de *Salmonella* afectan principalmente a los pollos recién nacidos hasta sus primeros 7 días de edad, posteriormente los pollos adquieren una resistencia natural a la enfermedad, incluso a dosis de 10^8 unidades formadoras de colonia por la vía natural³¹.

La infección de los pollos neonatos con *Samonella gallinarum*, nos permitirá evaluar la expresión del RNAm de IL-2 en este, durante los primeros días de vida.

A través de RT-PCR se ha evaluado la expresión del RNAm de las citocinas con un nivel de sensibilidad muy alto. Se han reportado varios procedimientos de RT-PCR para dicho fin³². En este trabajo se amplificará el gen de la IL-2 para después buscar una relación entre aves neonatas y su producción de IL-2 que nos pueda orientar a comprender el estado inmune y la resistencia de las aves a diferentes edades. Se espera que teniendo información sobre la IL-2 de pollo se contribuya en el estudio del sistema inmune aviar y su respuesta ante el estímulo de un patógeno como el de *Salmonella*¹⁶.



Fig. 1 La figura muestra un modelo para el complejo formado entre la interleucina 2 (IL-2) y su receptor trimérico. La IL-2 está coloreada en rojo, y las cadenas α , β , y γ del receptor. están coloreadas en amarillo, verde y azul, respectivamente.

III.-OBJETIVOS:

3.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar si el pollo neonato expresa RNAm de IL-2 en respuesta al estímulo de *Salmonella gallinarum*.

3.2.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la técnica de RT-PCR para la amplificación del gen de CD3 de pollo a partir de bazo.
- Establecer la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión del RNAm de IL-2 en el pollo a partir de esplenocitos totales de pollo estimulados con Concanavalina A.
- Evaluar la expresión del RNAm de IL-2 en el pollo neonato desafiado con *Salmonella gallinarum* a partir de esplenocitos totales de pollo.

IV.- HIPOTESIS:

Los pollos neonatos expresan RNAm de IL-2 en respuesta al estímulo con *Salmonella gallinarum*.

III.-OBJETIVOS:

3.1.-OBJETIVO GENERAL

Determinar si el pollo neonato expresa RNAm de IL-2 en respuesta al estímulo de *Salmonella gallinarum*.

3.2.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la técnica de RT-PCR para la amplificación del gen de CD3 de pollo a partir de bazo.
- Establecer la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión del RNAm de IL-2 en el pollo a partir de esplenocitos totales de pollo estimulados con Concanavalina A.
- Evaluar la expresión del RNAm de IL-2 en el pollo neonato desafiado con *Salmonella gallinarum* a partir de esplenocitos totales de pollo.

IV.- HIPOTESIS:

Los pollos neonatos expresan RNAm de IL-2 en respuesta al estímulo con *Salmonella gallinarum*.

V.- MATERIAL Y METODOS.

Para lograr los objetivos particulares se desarrolló la siguiente estrategia:

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA DE RT-PCR PARA LA AMPLIFICACION DEL GEN DE CD3 A PARTIR DE BAZO.

- Obtención de esplenocitos totales de pollo.
- Extracción de RNA
- Procedimiento de RT-PCR
- Secuenciación

5.2 ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA PARA LA EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE IL-2 DE POLLO A PARTIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO ESTIMULADOS CON CONCANAVALINA A.

- Expresión de IL-2 de pollo, a través de la activación de linfocitos con Conacavalina A.
- Extracción de RNA
- Procedimiento de RT-PCR
- Secuenciación.

5.3 EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm de IL-2 EN EL POLLO NEONATO DESAFIADO CON *Salmonella gallinarum* A PARTIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO.

- Desafío de pollos neonatos
- Extracción de RNA
- Procedimiento de RT-PCR para la amplificación del gen CD3 e IL-2
- Procedimiento de Nest-PCR para la amplificación del gen de IL-2.

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA DE RT-PCR PARA LA AMPLIFICACION DEL GEN DE CD3 A PARTIR DE BAZO.

AVES-

Se utilizaron aves ligeras B-300 de un día de edad a 3 semanas para la obtención de esplenocitos.

OBTENCION DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO:

Los bazos de pollo fueron colectados y macerados, siendo después filtrados por una malla de organza estéril, para tener una población celular uniforme. Las células se lavaron 3 veces con PBS, resuspendiéndose en 7 ml de HBSS con 10% de suero fetal bovino. Finalmente se contaron y resuspendieron en RPMI 1640 con 2% de suero de pollo a una concentración de 5×10^6 células por mililitro.

EXTRACCION DEL RNA

Se utilizó para la extracción de RNA el método de trizol y se siguió el protocolo descrito por Chomazynski y Sacchi³³ que consiste en:

Separación:

Se colectaron las células en tubos de centrifuga eppendorf de 1.5ml cada tubo contenía 1ml de medio con células. Se centrifugaron a $1200Xg$, se les retiró el sobrenadante y las células fueron lisadas con 1ml de trizol. Las muestras homogenizadas se incubaron por 5 min. a temperatura ambiente. Se adicionó 0.2ml de cloroformo por cada ml. de trizol. Se agitaron 15 segs. en el vortex e incubaron a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Se centrifugaron a $12000Xg$ por 15 min. a $4^{\circ}C$.

Precipitación:

Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se adicionaron 0.5 ml de isopropanol por 1 ml de trizol y se mezclaron. Las muestras fueron incubadas por 10 min. a temperatura ambiente. Se centrifugaron a no más de $12000 Xg$ por 10 min a $4^{\circ}C$.

Lavado:

Se removió el sobrenadante, el precipitado fue lavado con etanol al 75%, con un volumen igual al usado con trizol (1:1). La muestra fue mezclada y se centrifugó a no más de $7500 Xg$ por 5 minutos a $4^{\circ}C$.

Redisolución:

Se dejó secar el botón de RNA y se disolvió el RNA en agua DEPC con pocos pases de solución a través de la punta. Se incubó 10 min. a 55-60°C.

Se midió la concentración de RNA por medio de espectrofotometría con luz Ultravioleta a 260nm y se almacenó a -70°C.

PROCEDIMIENTO RT

1.- Se preparó la siguiente mezcla en un microtubo estéril puesto en hielo.

1µl Oligo (dT) 12-18) (500 µg/ml)

1-5µg RNA total.

Agua destilada estéril suficiente para 12µl.

2.- Se calentó la mezcla a 70°C por 10 min y se sumergió inmediatamente en hielo.

3.- Los tubos se centrifugaron brevemente

4.- Se agregó:

4µl amortiguador 5X

2µl 0.1 M DTT

1µl 10 mM dNTP mezcla (10 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP a un pH neutro)

y se agitó en vortex brevemente para después incubarse a 42°C por 2 minutos.

5.- Se agregó 1 µl de Super Script II y se mezcló por pipeteo.

6.- Se incubaron 50 min. a 42°C.

7.- Se inactivó la reacción por calentamiento a 70°C por 15 min.

8.- La cadena de cDNA se usó como templado para la amplificación en PCR.

PCR

Se amplificó el gen de CD3 como control de la amplificación de IL-2 en el Termocilcador Gen Amp PCR System 2400 Perkin Elmer.

Para la amplificación del gen de CD3 se utilizaron los siguientes iniciadores basándose en la secuencia publicada por Bernot A. y Auffray Ch. en 1991²⁶.

Secuencia 5' a 3': CTG AGC ATG AGT GTG AAA GAA

Correspondientes a los nucleótidos de la posición 106 a 126.

Secuencia 5' a 3': CTT GCG GGC CTT GGC AGT TGC

Esta secuencia es reversamente complementaria a los nucleótidos de la posición 535 a 555 en la cadena complementaria del DNA.

La amplificación se llevó a cabo con 10 μ M de cada primer, 5 U de Taq polimerasa, PCR buffer, 2 μ l de 10mM de dNTP Mix, 3 μ l de 50 mM $MgCl_2$, 10 μ l de amortiguador de PCR 10X, 2 μ l de la cadena complementaria de DNA obtenida de RT-PCR.

Se utilizaron 30 ciclos de: 94°C por 30 segs, 53°C por 25 segs, 72°C por 1:45 min.

Se observó y analizó la amplificación del gen por electroforesis a partir de un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, 45 minutos a 95 Volts.

Se verificó la amplificación del gen deseado por medio de enzimas de restricción por el tratamiento rápido utilizando la enzima *Bst* XI, cuyo sitio de corte se encuentra en la posición 499 de acuerdo a la secuencia que se tomó como base para la amplificación.

También se llevó a cabo la amplificación interna del producto de PCR utilizando los siguientes iniciadores:

Secuencia 5' a 3': GCT CCC ACC ATA TCA GGG ATT

Esta secuencia corresponde a los nucleótidos de las posiciones 346 a 366.

Secuencia 5' a 3': AGT GAT GCA ATA CAC AGC AAT

Esta secuencia es reversamente complementaria a los nucleótidos de la posición 403 a 423 en la cadena complementaria del DNA.

Se utilizaron 30 ciclos de: 94°C por 30 segs, 53°C por 25 segs, 72°C por 1:45 min.

Se observó y analizó la amplificación del fragmento por electroforesis a partir de un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio durante 45 min. a 95 Volts.

Se purificaron las bandas por separado empleando el kit GENCLEAN KIT (Stratagen).

Una vez purificadas las bandas se realizó de nuevo el corte con la enzima de restricción *Bst* XI por tratamiento rápido. Así mismo se realizó la amplificación interna a los productos de estas bandas. Se observó y analizaron los productos purificados, así como su corte por enzima de restricción y su amplificación interna por electroforesis a partir de un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio durante 45 min. a 95 Volts.

El producto de la amplificación interna de CD3 se secuenció en el Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el método automático.

5.2 ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA PARA LA EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE IL-2 EN POLLO APATIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO ESTIMULADOS CON CONCAVALINA A.

EXPRESION DE IL-2 DE POLLO .

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS CON CONCAVALINA A.

Cada bazo de pollo fué colectado y macerado siendo después filtrado por una malla de organza para tener una población celular uniforme. Las células se lavaron 3 veces con PBS resuspendiéndose en 7 ml de HBSS con 10% de suero fetal bovino. Las células se contaron y resuspendieron en RPMI1640 con 2% se suero de pollo, penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100µ g/ml) a una concentración de 5×10^6 células por mililitro.

Se formaron 3 grupos experimentales de cultivo celular:

- A) Células incubadas en medio RPMI suplementado
- B) Células a las cuales se les agregó medio RPMI suplementado con Concanavalina A, siendo este un mitógeno activador de los linfocitos T³⁴. Se utilizó una concentración final de 10µ g/ml y las células se incubaron a 40°C por 12hrs⁷.
- C) Células a las cuales se les reemplazó el medio con el sobrenadante del grupo B después de las 12 hrs. de estimulación con Concanavalina A.

EXTRACCION DEL RNA

A las células estimuladas con Concanavalina A se les recolectó el medio y se le agregó a las células del grupo C para evaluar activación de estas a las 24 horas a partir del sobrenadante del grupo B.

Se utilizó para la extracción de RNA por el método de trizol las células del grupo B, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de RNA para la amplificación del gen de CD3.

PROCEDIMIENTO DE RT

Se siguió el mismo programa sugerido para RT del gen CD3 descrito con anterioridad.

IL-2

PCR

Para la amplificación del gen de IL-2 se utilizaron los siguientes iniciadores, basándose en la secuencia obtenida por Sundick y Gill Dixon ¹⁶ en 1997:

Secuencia 5' a 3': ATG ATG TGC AAA GTA CTG ATC

Correspondientes a los nucleótidos de la posición 1 a 21

Secuencia 5' a 3': TTA TTT TTG CAG ATA TCT CAC

Esta secuencia es reversamente complementaria a los nucleótidos de la posición 412 a 432 en la cadena complementaria del DNA.

La amplificación se llevó a cabo con 10 µM de cada primer, 5 U de Taq polimerasa, 2 µl de 10mM de dNTP Mix, 3 µl de 50 mM MgCl₂, 10 µl de 10 X amortiguador de PCR, 2 µl de la cadena complementaria de cDNA obtenida de RT.

Se utilizaron 30 ciclos de: 94°C por 1 min, 50°C por 2 min, 72°C por 2 min

Los procesos de PCR se realizaron en el Termociclador Gen Amp PCR System 2400 Perkin Elmer.

Se observó y analizó la amplificación del fragmento por electroforesis a partir de un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Se verificó la amplificación del gen deseado por un corte con la enzima de restricción *Sst*I por medio del tratamiento rápido, cuyo sitio de corte se encuentra en la posición 161 de acuerdo a la secuencia que se tomó como base para la amplificación.

También se llevó a cabo la amplificación interna del producto de PCR utilizando los siguientes iniciadores:

Secuencia 5' a 3': GAA ATA TTG GAA AAT ATC AAG

Esta secuencia corresponde a los nucleótidos de las posiciones 121 a 141.

Secuencia 5' a 3': GAG GTT CTT TTC GAT ATT TTG

Esta secuencia es reversamente complementaria a los nucleótidos de la posición 289 a 309 en la cadena complementaria del DNA.

El producto de la amplificación de IL2 se secuenció en el Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el método automático.

5.3 EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE IL-2 EN EL POLLO NEONATO DESAFIADO CON *Salmonella gallinarum* A PARTIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO.

DESAFIO DE POLLOS NEONATOS:

Se monitoreó la expresión del gen para IL-2 en pollos neonatos desafiados con *Salmonella gallinarum*.

Se utilizaron aves ligeras B-300 ALPES de un día de edad. Se manejaron 2 grupos:

- a) Grupo control con 10 aves
- b) Aves inoculadas con *Salmonella gallinarum*. 32 aves

El inóculo para el desafío con *Salmonella gallinarum* fue preparado con Solución Salina Fosfatada estéril. Para el desafío se ajustó a una absorbancia de 1 a 260nm con luz UV, que equivale a una concentración de 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml. Finalmente el inóculo fue diluido con PBS para obtener una concentración final de 4×10^8 ufc/ml. Las aves fueron inoculadas por vía oral con 250 μ l, y al siguiente día fueron sacrificadas para la obtención de bazo.

EXTRACCION DE RNA

Se buscó la expresión del RNAm de IL-2 de los esplenocitos totales tanto de una ave del grupo control como de 4 aves desafiadas, al día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 postinoculación. Se realizó la extracción con el mismo procedimiento ya estandarizado con los esplenocitos estimulados con Concanavalina A. Se llevó a cabo el aislamiento bacteriológico observando las ufc que se cultivaron en agar Mc Conkey a partir del bazo rompiendo con Triton 10X los esplenocitos y liberando las bacterias. Se observó la mortalidad de las aves con la dosis utilizada de *Salmonella gallinarum*.

PROCEDIMIENTO DE RT-PCR

Se amplificaron los genes de CD3 e IL-2 siguiendo el mismo protocolo que en el establecimiento de la técnica de cada gene.

PROCEDIMIENTO DE NESTED-PCR para la amplificación del gen de IL-2.

Se realizó de la misma manera que en el establecimiento de la técnica para la evaluación de los genes de CD3 e IL-2.

IV.- RESULTADOS:

ESTABLECIMIENTO DE LA TECNICA DE RT-PCR PARA LA AMPLIFICACION DEL GEN DE CD3 A PARTIR DE BAZO.

Se logró la amplificación del gen de CD3 , sin embargo se encontró la amplificación de 2 bandas una de 450 pb (esperada) y otra de 350; considerando en un principio a la banda del peso no esperado como una amplificación inespecífica.

Se realizaron cambios tanto en concentraciones de los componentes de la reacción de PCR así como en las temperaturas y tiempos del ciclo de amplificación de PCR, sin embargo, no se logró la desaparición de esta banda.

Se incubaron las muestras con la enzima de restricción *BsfXI* y se observó que ambas bandas poseían el sitio de corte en el mismo lugar cortando 56 pb, de este modo se observó una banda de 400pb y otra de 300 pb. Se realizó la PCR interna (anidada) y se observó la amplificación de una sola banda del peso esperado de 77 pb. Por lo que se procedió a la purificación de las bandas de 450pb y 350pb por separado utilizando el kit GENCLEAN KIT (Stratagen) .

Una vez purificadas las bandas se realizó de nuevo el corte con la enzima de restricción *BsfXI* y se observó por separado la pérdida de 56 pb en ambos casos, así como su amplificación interna de 77pb en ambos casos. Por lo tanto sugerimos que ambas bandas corresponden a la amplificación del gen de la molécula de CD3. Este resultado nos permite evaluar la presencia de RNAm de Linfocitos T en el experimento final, manejándolo así como control positivo de nuestro procedimiento de amplificación del gen de IL-2 y en la evaluación del pollo neonato desafiado con *Salmonella gallinarum*. (Fig.2) El producto de la PCR interna de CD3 fué secuenciado teniendo una homología del 93% comprada con la publicada por Bernot A y Auffray C²⁶. (Fig. 3)

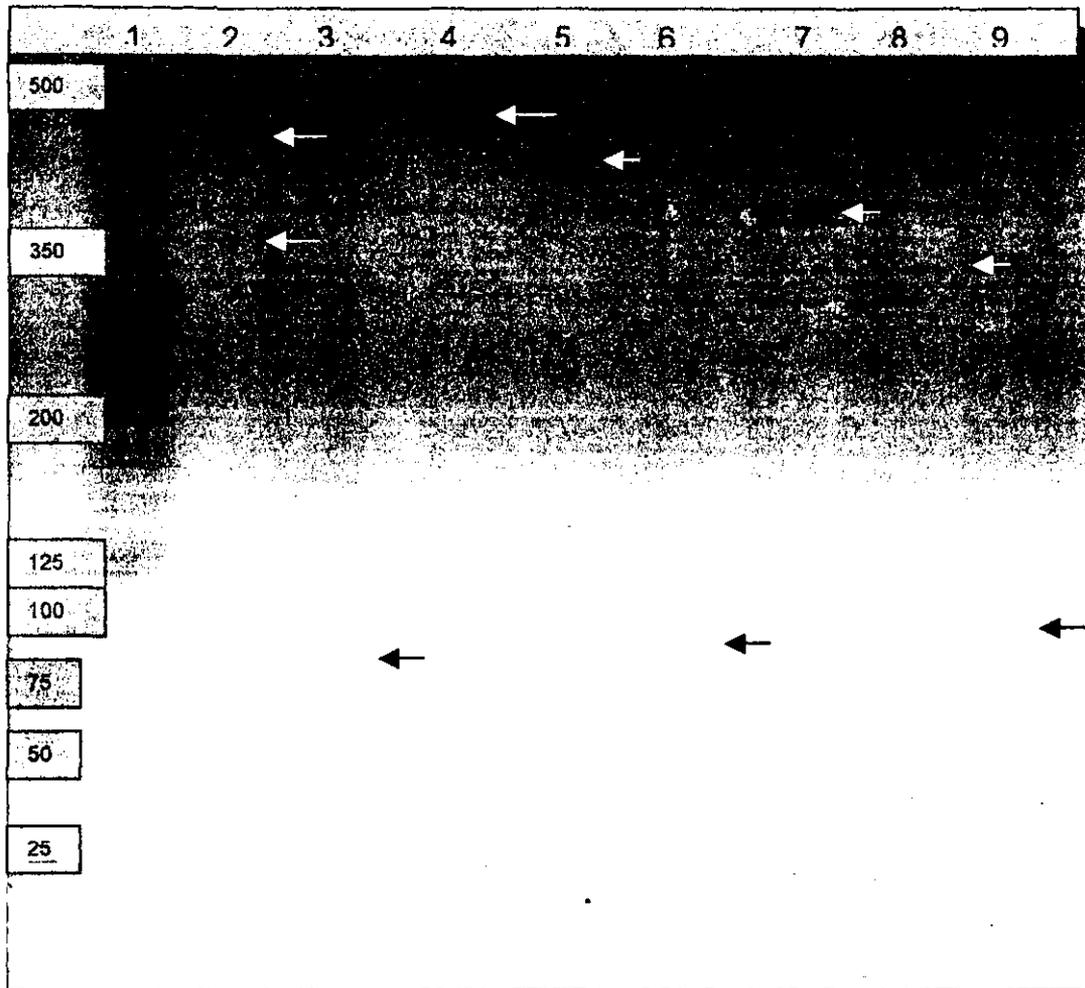


Fig.2. Amplificación del RNAm de CD3 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales .

Carril 1: Marcador de 25 pb

Carril 2: Amplificación de CD3 banda de 450pb y 350 pb.

Carril 3: PCR interna de la amplificación completa de CD3 banda de 77pb.

Carril 4: Banda de 450 pb purificada

Carril 5: Banda de 400pb correspondiente al corte con enzima *Bst*XI de la banda purificada de 450 pb.

Carril 6: Banda de 77pb correspondiente a la PCR interna de la banda purificada de 450 pb.

Carril 7: Banda de 350 pb purificada.

Carril 8: Banda de 300pb correspondiente al corte con enzima de *Bst*XI de la banda purificada de 350 pb.

Carril 9: Banda de 77pb correspondiente a la PCR interna de la banda purificada de 350 pb.

El DNA fue corrido en un gel de agarosa al 3%, con bromuro de etidio.

CD 3 DE POLLO

```
B/A:  TGGT_CGCAGATGTTGTCGCCACTGTCTTGCTGGCAATTGCTG
Esp:  TGGT5N10CCCANA_GTTGTCGCCACTGTCTTGCTGGCAATTGCTG
B/A:  TGTATTGCATCACTA
Esp:  TGTATTGCATCACTA
```

Fig. 3 Comparación de la secuencia promotora de CD3 de pollo amplificada a partir de esplenocitos totales de pollo (Esp) con la publicada por Bernot A y Auffray C ²⁶. (B/A)

EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE IL-2 EN POLLO A PARTIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO ESTIMULADOS CON CONCANAVALINA A.

La activación de linfocitos se observó de manera indirecta a través de la observación de acúmulos en formas de racimos de estas células después de las 24 horas postactivación. Se tomó el sobrenadante de las células activadas con Concanavalina A a las 12 horas postactivación, y se probó la activación de este sobrenadante activando otras células sin concanavalina A observándose del mismo modo activación a las 6 horas después de agregarles el sobrenadante, mientras en nuestro control negativo no se observó activación celular.

Se tomó a las 4 horas postactivación células estimuladas con Concanavalina A, para ser lisadas con trizol y se realizó la amplificación con las secuencias y condiciones ya descritas en material y métodos para la amplificación de CD3 y de IL-2.

Se observó la banda esperada de 432pb que correspondía al tamaño esperado de la amplificación del gen de IL-2. Se hizo el corte con la enzima *Sst*I observándose una banda de 271 pb que correspondía a la banda de mas pares de bases del corte. Se realizó la PCR interna a partir del gen amplificado y se observó la banda esperada de 188pb. (Fig.4) El producto de la RT-PCR de IL-2 fué secuenciado teniendo una homología del 95.7% comprada con la publicada por Kaiser P y Mariani P ¹¹. (Fig.5)

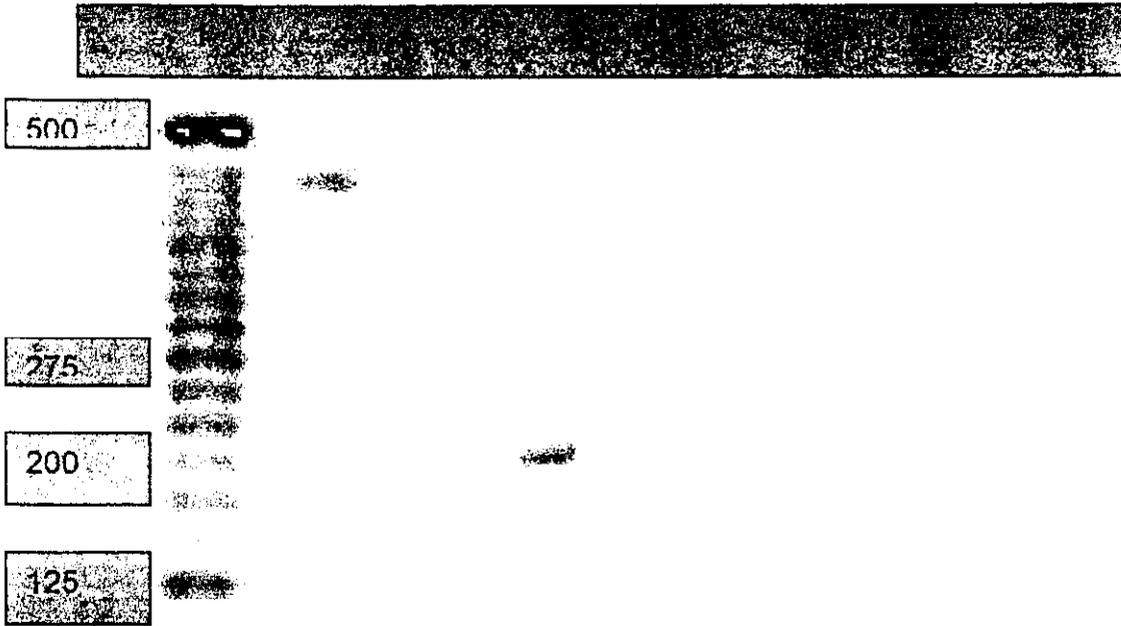


Fig.4. Amplificación del RNAm de IL2 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales .

Carril 1: Marcador de 25 pb.

Carril 2: Banda de 432 pb correspondiente a la amplificación del RNAm de IL-2.

Carril 3: Banda de 271 pb correspondiente al corte de la banda amplificada de 432pb de IL-2 con la enzima SsfI.

Carril 4: Banda de 188 pb correspondiente a la PCR interna a partir de la amplificación de 432pb de IL-2.

El DNA fue corrido en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

EVALUACION DE LA EXPRESION DEL RNAm DE IL-2 EN EL POLLO NEONATO DESAFIADO CON *Salmonella gallinarum* A PARTIR DE ESPLENOCITOS TOTALES DE POLLO.

Se observaron claramente las lesiones causadas por la *Salmonella gallinarum* durante el desarrollo de la enfermedad dentro de las que destacaron la presencia de esplenomegalia, hígados bronceados, enteritis y neumonía entre otras. La presencia de estas lesiones fue constante hasta el día 7, a partir del cual la observación de estas lesiones disminuyó considerablemente. Se observó claramente las diferencias con los pollos controles quienes no presentaron ninguna lesión.

Se logró el reaislamiento de *Salmonella* a partir del bazo haciendo cultivo en agar Mc Conkey tanto de los pollos inoculados como de los pollos del grupo control, esta fue en aumento gradual hasta el quinto días postinoculación, en el cual se alcanzó el pico máximo de la recuperación de la bacteria; observando disminución de bacterias recuperadas a partir del séptimo día postinoculación, no habiendo aislamiento de la bacteria en los pollos del grupo control.

Con esta dosis de *Salmonella* utilizada para el desafío de los pollos se observó el 5% de mortalidad el día 5 postinoculación.

Se observó amplificación clara y evidente del RNAm de CD3 desde el primer día postinoculación, tanto en animales desafiados, como en los controles. (Fig.6)

No se observó la amplificación del RNAm de IL-2 tanto en animales desafiados como en no desafiados, por lo tanto se hizo PCR interna y se observó amplificación de IL-2 desde el primer día postinoculación tanto en animales desafiados como en animales control. (Fig.7)

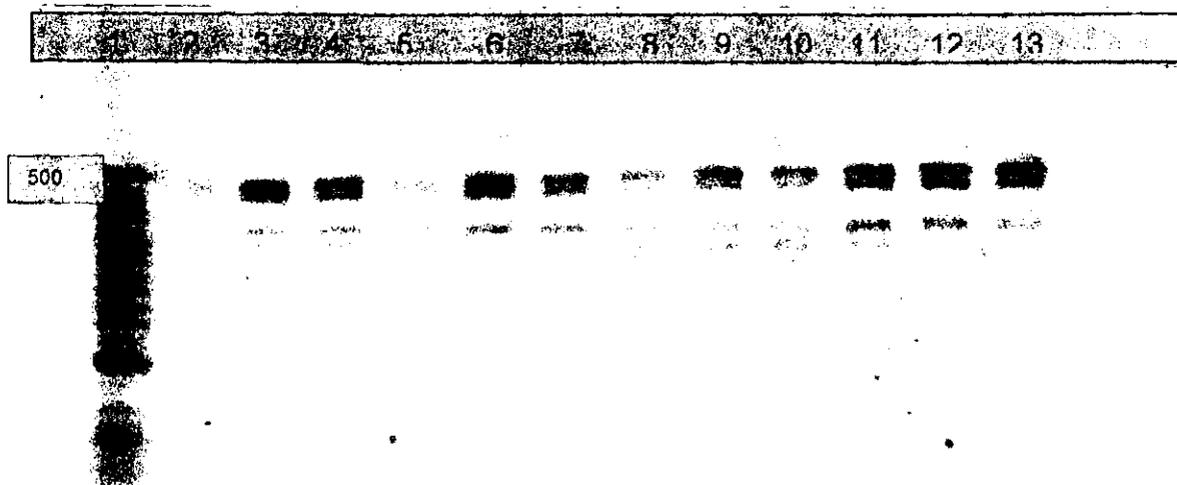


Fig.6 Amplificación del RNAm de CD3 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos de pollo

Carril 1: Marcador de 25pb

Carril 2: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 5 días no inoculada.

Carril 3: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 5 días inoculada.

Carril 4: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 5 días inoculada.

Carril 5: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 6 días no inoculada

Carril 6: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 6 días inoculada

Carril 7: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 6 días inoculada

Carril 8: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 7 días no inoculada

Carril 9: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 7 días inoculada

Carril 10: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 7 días inoculada

Carril 11: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 10 días no inoculada

Carril 12: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 10 días inoculada

Carril 13: Bandas de 450 y 350pb correspondientes a la amplificación a partir de aves de 10 días inoculada.

El DNA fue corrido en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

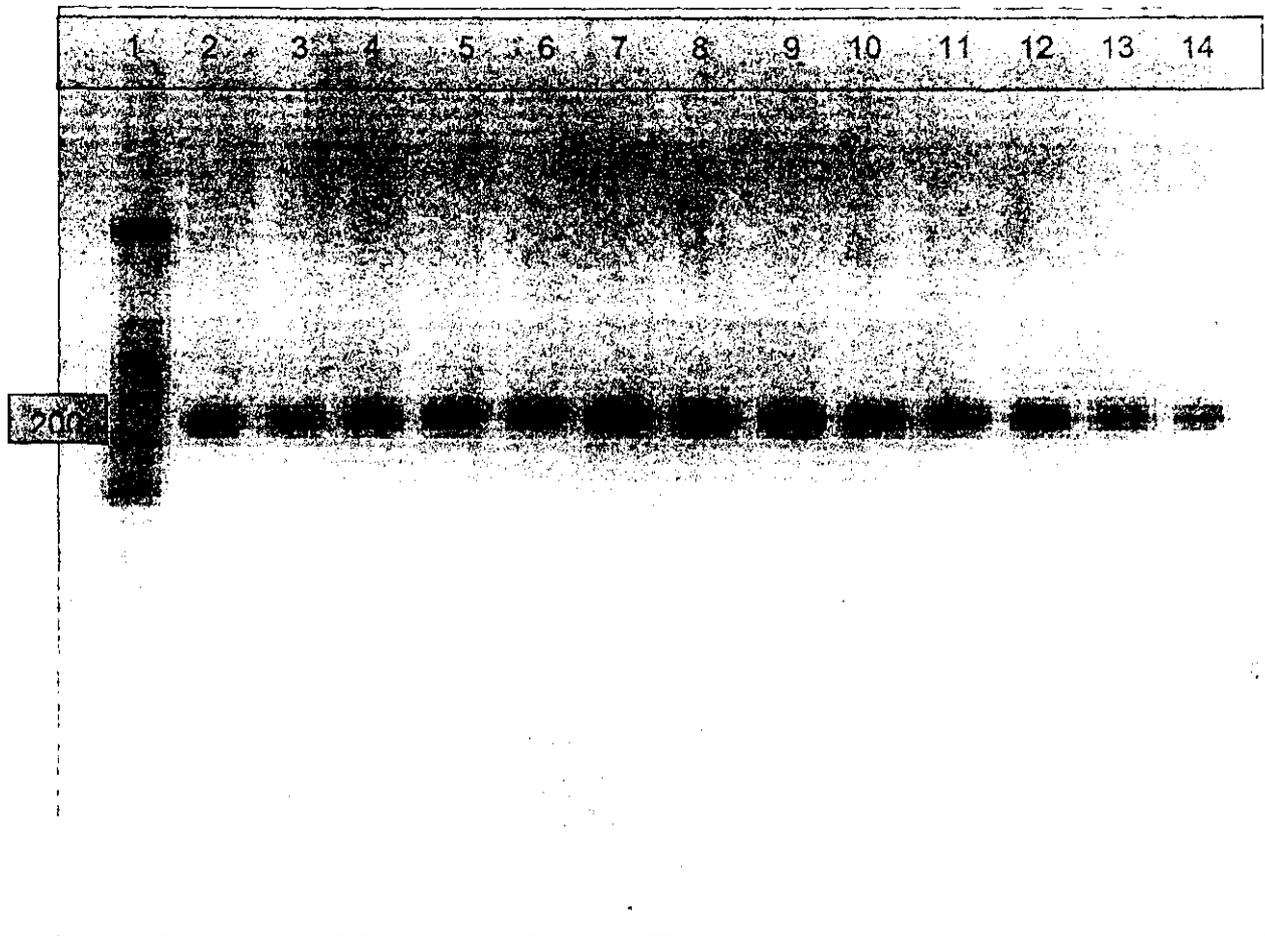


Fig.7. Amplificación del RNAm de IL2 de pollo por RT-PCR a partir de RNA total de esplenocitos totales .

Carril 1: Marcador de 25pb

Carril 2: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 5 días no inoculada.

Carril 3: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 5 días inoculada.

Carril 4: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 5 días inoculada.

Carril 5: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 6 días no inoculada

Carril 6: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 6 días inoculada

Carril 7: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 6 días inoculada

Carril 8: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 7 días no inoculada

Carril 9: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 7 días inoculada

Carril 10: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 7 días inoculada

Carril 11: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 10 días no inoculada

Carril 12: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 10 días inoculada

Carril 13: Banda de 188pb de la amplificación a partir de aves de 10 días inoculada

Carril 14: Banda de 188pb de la amplificación a partir de esplenocitos estimulados con Concanavalina A.

El DNA fue corrido en un gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

V.-DISCUSION

AMPLIFICACION DEL GEN DE CD3.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que las bandas amplificadas a partir de los esplenocitos totales de pollo coinciden en cuanto a su sitio de corte de restricción y su PCR interna a la secuencia del gen de CD3 obtenida por Alain Bernot y Charles Auffray²⁶, quienes además sugieren la posibilidad de que esta sea una forma ancestral de las cadenas γ y δ de los mamíferos; y que alternativamente se de una duplicación del gen. También al igual que Pat Bucy²⁷ se demostró la transcripción de esta molécula en etapa embrionaria, por lo tanto nos permitió monitorear la presencia del RNAm en los esplenocitos de nuestras aves experimentales. Considerando que David Char et. al.²⁵ demostraron que los timocitos que expresan esta moléculas son principalmente linfocitos T CD4+ CD8- (80%) la amplificación observada nos permite sugerir que se trata de Linfocitos CD4+.

Como en las células de murino y humano, los linfocitos T de aves expresan RNAm de CD3. En el ratón, se ha demostrado que los timocitos, esplenocitos y una línea de células T a partir de linfoma, también expresan múltiples transcripciones de CD3 δ de tamaño similar. Miles F. Wilkinson et. al.²³ observaron múltiples transcripciones de CD3 δ en esplenocitos de murino. En el humano, se ha reportado que las células T que no expresan transcripciones alternativas bloquean la región transmembranal condificada. Por lo tanto parece ser que la expresión del gen de CD3 δ esta modulada por un mecanismo represor de la transcripción²⁴. Del mismo modo se ha encontrado que la transcripción de algunas moléculas como es el caso de pTAC12 y OCT-1 de las cuales se conocía poco, han correspondido a transcripciones alternativas del CD3 δ u otras cadenas del CD3^{24,35}. Las 2 bandas amplificadas a partir de los esplenocitos totales de pollo corresponden a la amplificación del gen de CD3, sugiriendo que la banda de menor número de pares de bases, corresponde a una transcripción alternativa de este gen.

AMPLIFICACION DEL GEN DE IL-2.

La primera purificación parcial y caracterización de la IL-2 de pollo fue publicada en 1992 por Myers *et. al.* ³⁶. En 1997 Sundick R y Gill-Dixon C ¹⁶ realizan la primera clonación de IL-2, sin embargo, encuentran homología con la IL-15. La IL-15 es una citocina recientemente caracterizada (1994) que presenta muchas de las propiedades biológicas de la IL-2, incluyendo la activación y proliferación de las células T y una interacción específica con las subunidades y del receptor de la IL-2; pero su patrón de expresión es distinto ^{37,38,39} y finalmente en 1999 Kaiser P y Mariani P ¹¹, demuestran que lo obtenido por Sundick RS y Gill-Dixon CA ¹⁶ en 1997 es IL-2 y no IL-15.

A partir de los trabajos publicados por Sundick R y Gill-Dixon C ¹⁶, Kaiser P y Mariani P ¹¹ demuestran la presencia y secuencia de la IL-2 de pollo. En base a sus hallazgos, se amplificó el gen de IL-2 a partir de esplenocitos totales de pollo estimulados con Concanavalina A. De la amplificación del gen de IL-2 de esplenocitos totales de pollo se obtuvo una secuencia con una homología del 95.7% comparada con la publicada por Sundick y Gill Dixon ¹⁶, por lo tanto a la misma IL-2 de estos estudios con lo cual a su vez se confirma que no es IL-15 no encontrando diferencias aún siendo diferentes tipos de aves; mientras los hallazgos en ratones de diferentes cepas indican diferentes moléculas de IL-2, lo cual explicaría en parte la resistencia de diferentes tipos de animales a algunos agentes como *Salmonella*, no siendo el mismo caso en las aves ⁴¹.

EVALUACION DEL RNAm DE IL-2 EN EL POLLO NEONATO DESAFIADO CON *Salmonella gallinarum*.

Paul W E y Sender R A ⁴¹ mencionan que las células T nativas representan a aquellas que relativamente acaban de emigrar del timo y que no han encontrado antígeno. Estas células expresan pequeñas cantidades de CD4+ y cuando son estimuladas por el receptor en una señal coestimuladora las células nativas CD4+ producen IL-2 pero no IL-4 o INF γ . Generalmente las células que producen INF γ disminuyen su capacidad de producir IL-2 y no producen IL-4. También explican, que hay resultados que indican sólidamente el hecho de que las células nativas CD4+ pTH o multipotenciales y el evento inicial que determina el fenotipo de linfocina que producen no es selectivo, sino que influyen factores presentes en la primera estimulación. Se han hecho experimentos que indican que las citocinas por si mismas son factores importantes en la adquisición de su fenotipo. Aunque las células presentadoras de antígeno específicamente dirigen a las células TH a desarrollarse como TH1, o en las células TH2. Se ha observado que los macrófagos activados, así como los obtenidos por incubación con *Listeria monocytogenes*, diferencian a los linfocitos para la producción de INF γ . Esto nos podría explicar el no obtener grandes cantidades de transcripción de IL-2 que se pudieran considerar de gran importancia en la inmunidad contra *Salmonella gallinarum*. Se deben de realizar estudios en los cuales se monitoree la amplificación del gen de INF γ , lo cual nos podría explicar el comportamiento del gen de IL-2. Swain S L ⁴² menciona el papel de la IL-2 para la diferenciación de las células TH, por tal motivo existe la posibilidad de que al no producirse IL-2 la citocina que esté jugando un papel importante sea el INF γ en la respuesta inmune del pollo neonato contra *Salmonella gallinarum*.

Garrity P ⁴³ menciona que para realizarse la transcripción de la IL-2 se debe de llevar acabo la activación de todo un complejo de proteínas. También que el hecho de que hay una fuerte competencia entre las proteínas activadoras y represoras por ocupar los sitios de unión de los linfocitos T, los cuales no se han identificado en el pollo neonato, por lo tanto podrían aún no estar completos para producir la señal y hacer la transcripción de la IL-2.

Otro factor importante, es la vida media del RNAm ya que Shaw J et al. ⁴⁴ demuestran que este es de 1 a 2 horas en líneas celulares y en células linfoides de humano. También demostraron que las células Jurkat de humano muestran un rápido incremento del RNAm de la IL-2 durante su inducción, seguida de una declinación rápida que fue de 4 a 6 horas después. En el presente estudio se tomaron muestras cada 24 horas por lo tanto es posible que no se haya detectado este pico máximo de la producción de RNAm de IL-2.

También se sugiere la presencia de receptores coestimuladores que optimizan la producción de IL-2 como el CD28, un receptor que interactúa con la familia de proteínas B7 expresadas en las células presentadoras de antígeno. La estimulación combinada de anticuerpos anti-CD28 y anti-TCR incrementan de 30 a 100 veces más la producción de IL-2 que la estimulación sólo de anticuerpos anti-TCR.^{45,46} Por lo tanto sería conveniente evaluar la presencia de la molécula CD28 en el linfocito T de pollo neonato.

Del mismo modo se ha encontrado que en ratones de 3 a 9 meses de edad, el estímulo anti-CD3 solo, no es suficiente para inducir la producción de IL-2 en las células CD4+, y que se requiere de la estimulación del CD28 para producir una mayor cantidad de IL-2, y que la producción del INF γ solo necesita la estimulación del CD3, además de que el RNAm de INF γ , IL-4 e IL-10 es más estable en animales viejos que en jóvenes, sugiriendo así que la estabilidad tiene un papel importante en los patrones de producción de citocinas.²²

Talebi, Torgerson y Mulcahy⁴⁷ evaluaron la proliferación de los linfocitos de sangre estimulados con Concanavalina A y encontraron muy poca respuesta de estos hasta la tercera semana de edad, en la cual encontraron mayor respuesta a este estímulo ya que después comienza a declinar, en este experimento ellos utilizaron aves Cobb500. En el presente estudio se realizó la activación *in vivo* de las aves B300 ya que en esta se ha visto resistencia a la *Salmonella gallinarum* y en la búsqueda de encontrar la molécula principal en esta respuesta se buscó la amplificación del gen de IL-2, encontrándose amplificación de RNAm de IL-2 en los linfocitos estimulados con Concanavalina A en estas aves por medio de RT-PCR, no siendo así en el caso de los pollos neonatos después de la infección con este agente.

VI.- CONCLUSIONES

1.- En el presente estudio se logró la amplificación del gen de CD3 encontrándose una posible transcripción alternativa de este, sin embargo como control nos permitió evaluar la transcripción en la evaluación de la amplificación del gen de IL-2 tanto en los esplenocitos estimulados con Concanavalina A, así como en nuestros pollos neonatos desafiados con *Salmonella gallinarum*.

2.- Los esplenocitos totales activados con Concanavalina A a una concentración de 10µg / ml. transcriben IL-2 y se puede detectar a las 12 horas post activación.

3.- La amplificación de IL-2 obtenida a partir de las aves B300 es 95.7% homóloga a la secuencia obtenida por Kaiser P y Mariani P. ¹¹

4.- El pollo neonato desafiado con *Salmonella gallinarum* no expresa RNAm de IL-2 a partir de esplenocitos totales en cantidades suficientes para ser detectados por RT-PCR sin embargo, la expresión de RNAm de IL-2 por PCR interna es detectada desde el primer día de edad tanto en pollos desafiados, como en controles, lo que indica que se está realizando la transcripción de esta pero no a niveles detectables por esta técnica.

5.- Sería conveniente realizar estudios que indiquen si otra citocina tiene importancia en la resistencia de los pollos neonatos a *Salmonella gallinarum*, así como estudios para saber a que se debe que la IL-2 no es la citocina principal en la respuesta inmune a *Salmonella gallinarum*.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VII.-LITERATURA CITADA

- 1.- Finlay BB, Brumell JH. *Salmonella* interactions with host cells: *in vitro* to *in vivo*. *Phibs Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000;355:623-631.
- 2.- Henderson SC, Bounous DI, Lee MD. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infect and Imm* 1999;67:3580-3586.
- 3.- Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiol* 2000; 146:3217-3226.
- 4.- Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* 1999;171:5-26.
- 5.- Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine* 1999;17:2538-2545.
- 6.-Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.
- 7.-Myers TJ, Lillehoj HS, Fetterer RH. Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;34:97-114.
- 8.-Goldsmith MA, Greene WC. Interleukin-2 and the interleukin-2receptor. In: Thomson A, editor. *Cytokine handbook*. United States of America:Academic Press, 1994:57-75.
- 9.-Riegel JS, Corthesy B, Flanagan Wm, Crabtree GR. Regulation of the Interleukin-2 gen. In: Kishimoto T, editor. *Interleukins:Molecular Biology and Immunology*. Switzerland:Karger,1992:266-289.
- 10.-Bazan JF. Unraveling the structure of IL-2. *Science* 1992;257:410-413.
- 11.-Kaiser P, Mariani P. Promoter sequence, exon:intron structure, and synteny of gentic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15.*Immunogenetics* 1999;49:26-35.

- 12.-Garrity PA, Chen D, Tothenberg EV, Wold BJ. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 1994;14:2159-2169.
- 13.-Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gen. *Curr Opin Immunol* 1995;7:333-342.
- 14.-Shaw J, Meerovith K, Bleackley CR, Paetkau V. Mechanisms regulating the level of IL-2 mRNA in T lymphocytes. *J Immun* 1988;140:2243-2248.
- 15.-Toribio ML, Gutiérrez-Ramos JC, Pezzi L, Marcos MAR, Martínez -A C. Interleukin-2-dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* 1989;342:82-85.
- 16.-Sundick RS, Gill-Dixon C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immun* 1997;159:720-725.
- 17.-Aggarwal BB, editor. Human cytokines. Handbook for basic and clinical research. United States of America: Blackwell Science, 1998.
- 18.-Kaplan MH, Smith DI, Sundick RS. Identification of a G protein coupled receptor induced in activated T cells. *J Immun* 1993;151:628-636.
- 19.-Yokota T, Arai N, Lee F, Rennick D, Mosmann T, Arai K. Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: Expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:68-72.
- 20.-Clemens MJ. Therapeutic uses of cytokines. In: Read AP, Brown T, editors. Cytokines. United Kingdom: Bios scientific publisher, 1991:102-103.
- 21.-Swain S. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 1991;3:304-310.
- 22.-Pioli C, Pucci S, Barile S, Frasca D, Doria G. Role of mRNA stability in the different patterns of cytokine production by CD4+ cells from young and old mice. *Immunol* 1998;94:380-387.
- 23.-Wilkinson M, Georgopoulos K, Terhorst C, MacLeod C. The CD3 δ gen encodes multiple transcripts regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Eur J Immunol* 1989;19:2355-2360.

- 24.- Takase K, Okazaki Y, Wakizaka K, Shevchenko A, Mann M, Saito T. Molecular cloning of pTAC12 an Alternative Splicing Product of the CD3 γ chain as a component of the Pre-T cell antigen-receptor complex. J Biol Chem 1998;273:30675-30679.
- 25.-Char D, Sanchez P, Chen CH, Bucy P, Cooper M. A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor α -3-specific antibody. J Immunol 1990;145:3547-3555.
- 26.-Bernot A, Auffray Ch. Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. Proc Natl Acad Sci 1991;88:2550-2554.
- 27.-Bucy P, Chen CH, Cooper M. Development of cytoplasmic CD3+/T cell receptor-negative cells in the peripheral lymphoid tissues of chickens. Eur J Immunol 1990;20:1345-1350.
- 28.-Matesanz F, Alcina A. Glutamine and tetrapeptide repeat variations affect the biological activity of different mouse interleukin-2 alleles. Eur J Immunol 1996;26:1675-1682.
- 29.-Lo W-F, Ong H, Metcalf E, Soloski M. T cell responses to Gram-Negative Intracellular bacterial pathogens: a role for CD8+ T cells in immunity to *Salmonella* infection and the involvement of MHC class Ib molecules. J Immunol 1999;162:5398-5406.
- 30.-Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. Immunol Reviews 1999;171:5-26.
- 31.-Ziprin RL, Corrier DE, Elissalde MH. Maturation of resistance to Salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by Cyclosporine. Poult. Sci. 68:1637-1642.
- 32.-Platzer C, Blankenstein T. Polymerase chain reaction to quantitate cytokine mRNA. In: Balkwill FR, editor. Cytokines A practical approach. 2nd ed. United states of america: IRL Press, 1995:57-68.
- 33.-Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-159.

- 34.-Talebi A, Torgerson PR, Mulcahy G. Optimal conditions for measurement of blastogenic responses of chickens to concanavalina A in whole blood assays. *Vet Immunol Immunopath* 1995;46:293-301.
- 35.-Lerner A, D'Adamo L, Diener A, Clayton L, Reinherz E. CD3 ζ / η / θ locus is colinear with and transcribed antisense to the gene encoding the transcription factor Oct-1. *J Immunol* 1993;151:3152-3162.
- 36.-Myers T, Lillehoj H, Fetterer R. Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet Immunol Immunopath* 1992;34:97-114.
- 37.-Anderson DM, Johnson L, Glaccum MB, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, *et al* . Chromosomal assignment and genomic structure of IL15. *Genomics* 1995;25:701-706.
- 38.-Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, *et al*. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the δ chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994;264:965-968.
- 39.-Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann T A. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996;4:329-336.
- 40.-Matesanz F, Alcina A, Pellicer A. Existence of at least five interleukin-2 molecules in different mouse strains. *Immunogenetics* 1993;38:300-303.
- 41.-Paul W, Seder R. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-251.
- 42.-Swain S. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Current Opinion Immunol* 1991;3:304-310.
- 43.-Garrity P, Chen D, Rothenberg E, Wold B. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14:2159-2169.
- 44.-Shaw J, Meerovitch K, Bleackley C, Paetkau V. Mechanisms regulating the level of IL-2mRNA in T lymphocytes. *J Immunol* 1988;140:2243-2248.

- 45.-Jugnu J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gen. *Current Opinion Immunol* 1995; 7:333-342.
- 46.-Powell J, Ragheb J, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz R. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy.
- 47.-Talebi A, Torgerson P, Mulcahy G. Optimal conditions for measurement of blastogenic responses of chicken to concanavalin A in whole blood assays. *Vet Immunol Immunopath* 1995;46:293-301.