



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUATITLAN

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
INDUCIDA POR UNA CEPA DE
Actinobacillus seminis EN EL MODELO MURINO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIO PATLANI MORENO

ASESORES:

DRA. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO
DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria:

A mis padres Isabel Moreno Ortiz y José Guadalupe Patlani González por su determinación, y entrega que me ha enseñado tanto, por ser los responsables de mi formación lo cual realizaron con mucho amor; ya que sin ellos este sueño no hubiera sido completado, a mis hermanos que siempre he contado con ellos, por su amistad y apoyo Delia Patlani Moreno y José Patlani Moreno; a mis sobrinos Fausto Gael Juárez Patlani y Dereck Juárez Patlani por que siempre alimentan mi alma.

Agradecimientos:

A Dios por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme la capacidad y fuerza para levantarme de cada tropiezo y llegar hasta aquí.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente a la FESC en donde aprendí más que números y letras, por la oportunidad de ser parte de ella.

Al Dr. Enrique Salas Téllez y la Dra. Alma Núñez del Arco que me brindaron su confianza, dedicación amistad incondicional con quienes estaré infinitamente agradecido, por todo lo recibido durante el tiempo que duro la tesis, por su apoyo en mi desarrollo profesional, por compartir sus conocimientos, orientación, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y motivación, que han inculcado en mi un sentido de seriedad y responsabilidad.

A la Cátedra de Profilaxis e Inmunodiagnóstico de enfermedades Bacterianas y Micóticas a cargo del Dr. Enrique y la Dra. Alma que permitió el desarrollo del presente trabajo y mis inicios como Profesor.

A la Dra. Sara Esther Valdés Martínez y la Dra. Carolina, Sergio el laboratorista Moreno, por su amistad, apoyo y por el uso de su laboratorio. (L-9 Posgrado)

A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por su amistad, sus conocimientos, su apoyo, sus consejos y por el uso de su laboratorio.

A todos mis profesores de la carrera y a mis sinodales gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

A mi generación QFB 26.

A mis amigos quienes han sido tantas veces parte aguas de mi vida, han marcado mi vida de alguna forma, con quienes tantas veces compartimos horas de estudio, la emoción por un examen, desveladas, sueños e ilusiones, quienes me brindaron su amistad, cariño y apoyo en todo momento, le doy gracias a Dios por haberlos puesto en mi camino. Los llevare siempre en mi corazón.

Por todos los momentos compartidos, fiestas, risas, tristezas y enojos que pasamos juntos: Jael Sánchez Hernández (Yolis) muchas gracias por tu comprensión, apoyo, por escucharme y sobre todo por tu amistad incondicional y tus risa inagotable , Beatriz Machuca Reyes (Betychica) muy callada pero superespecial; espero no estés durmiendo cuando leas las dedicatorias, gracias por tu amistad incondicional y por que tu posición neutral en todo, Selene Lozano Sánchez (Chelene) muy buena amiga aunque algo fresa jeje es broma, Brenda Palmas Flores (Brenderella) gracias por escucharme y tus puntos de vista; Octavio Gonzales Baca (Octavozooito). Pero sobre todo, a que gracias al equipo que formamos logramos llegar al final del camino y que hasta el momento seguimos siendo amigos.

Isabel Flores González (Chabela) gracias por tu amistad y apoyo en mi trabajo de tesis por que cuidabas de mis cepas y me suplías cuando no estaba, Laura y su Nacho, Gabriela Sánchez Luis (Gabota), Paco, gracias por los momentos compartidos en el laboratorio de posgrado, donde aprendimos, compartimos, disfrutamos de conversaciones y risas.

A todos los que colaboraron indirectamente

Gracias desde lo más profundo de mí ser.

Mario Patlani Moreno



Você é assim
Um sonho pra mim
E quando eu não te vejo

Eu penso em você
Desde o amanhecer
Até quando eu me deito

Eu gosto de você
E gosto de ficar com você
Meu riso é tão feliz contigo
O meu melhor amigo é o meu amor

E a gente canta
E a gente dança
E a gente não se cansa

De ser criança
Da gente brincar
Da nossa velha infância

Seus olhos meu clarão
Me guiam dentro da escuridão
Seus pés me abrem o caminho
Eu sigo e nunca me sinto só

INDICE

Tabla de Contenido	I
Lista de figuras.....	III
Lista de tablas.....	III
Lista de graficas	III
Abreviaturas	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de la epididimitis.....	1
1.1.2. Etiología de la epididimitis.....	2
1.2 Antecedentes. de la epididimitis.....	6
1.3 Aspectos microbiológicos de <i>Actinobacillus seminis</i>	7
1.5 Patogénesis de epididimitis causada por <i>A. seminis</i>	10
1.6 .Signos clínicos de la epididimitis.....	12
1.7 Diagnóstico de <i>A. seminis</i>	14
1.7.1 .Otras patologías parecidas a la epididimitis.....	16
1.8 Importancia antigénica de <i>A. seminis</i>	18
1.8.1 Importancia de la proteína de 75 kDa de <i>A. seminis</i>	18
1.9 Respuesta Inmune (IL-2, IFN- γ e IL-4).....	19
1.9.1 Interleucina 2 (IL-2).....	20
1.9.2 Interleucina 4 (IL-4).....	21
1.9.3 Interferón gamma (IFN- γ).....	22
1.9.4 Hipersensibilidad Tardía (DTH; Delayed Type Hypersensitivity).....	23
II. JUSTIFICACION.....	25
III. HIPOTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27

V. MATERIAL Y MÉTODOS..	28
5.1 Preparación de inóculo.	28
5.2 Estudio bacteriológico de <i>A. seminis</i>	28
5.3 Inmunización con células completas de <i>A. seminis</i>	28
5.4 Protocolo de inmunización.	28
5.4 Protocolo de inmunización.	28
5.5 Preparación del cultivo primario de células del bazo de ratón.	29
5.5.1 Cultivo celular.	29
5.5.2 Inoculación del cultivo primario con células del bazo del ratón	31
5.6 Medición de Interleucinas (IL-2, IFN- γ e IL-4).....	31
5.7 Determinación de Hipersensibilidad tardía (DTH).....	34
VI. RESULTADOS.	35
6.1 Análisis estadísticos para interleucinas).....	36
6.2 Hipersensibilidad tardía (Prueba de DTH).	38
6.3 Análisis estadísticos para Prueba de DTH.....	39
VII. DISCUSIÓN.	41
VIII. CONCLUSIONES.	46
IX. REFERENCIAS.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Agentes etiológicos de la epididimitis).....	4
Tabla 2 Propiedades Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con la epididimitis ovina	5
Tabla 3 Especies del genero Actinobacillus).....	8
Tabla 4 Diagnostico diferencial de <i>A.seminis</i>	16
Tabla 5 Concentraciones empleadas en la medición de interleucinas.....	32
Tabla 6 Concentración de interleucinas obtenidas en la medición del sobrenadante de cultivo celular de bazo de ratón.....	35
Tabla 7 Análisis estadístico de t-student (bilateral) de la medición de Interleucinas obtenidas.....	36
Tabla 8 Análisis estadístico t-student (bilateral) de la prueba DTH.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de liberación de IL-2.....	21
Figura 2 Liberación de IL-4.....	22
Figura 3 Liberación de IFN- γ	23
Figura 4 Representación esquemática de la implicación de las células Th1 yTh2 en la respuesta inmune celular y humoral mediante la liberación de interleucinas.....	24

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1 Estándar de IL-2, IL-4 e INF- γ -2.....	37
Grafica2 Inducción de IL-2, IL-4 e INF- γ en células de ratón Balb/c estimuladas con células completas de <i>A. seminis</i>	38
Grafica 3 Prueba DTH.....	40

ABREVIATURAS

ATCC	(American Type Culture Collection) Colección de Cultivo Tipo Americano
μL	Microlitro
BPGN	Bacilos Pleomórficos Gram Negativos
CD	(Cluster of differentiation) Antígenos de diferenciación celular.
CP	Célula Plasmática
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
D.O.	Densidad Óptica.
DTH	(Delayed Type Hypersensitivity). Hipersensibilidad de tipo tardía o retardada.
ELISA	(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Prueba inmunoabsorbente ligado a enzimas
F.C.	Fijación de Complemento.
<i>Xg</i>	Gravedades
HAP	Grupo <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> y <i>Pasteurella</i>
HS-PEC	Hot saline – Poli ε-caprolactona Microparticulas.
I.D.D.	Inmunodifusión doble.
IFN-γ	Interferón–gamma
Ig (M, G, D)	Inmunoglobulina ya sea de tipo M, G o D
IL	Interleucina

kDa	Kilodalton
LB	Linfocito B
LPS	Lipopolisacarido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MPM	Marcadores de peso molecular
N	Normalidad (numero de equivalentes/litro)
ng	Nanogramo
NK	(Natural Killer) Célula asesina natural
OIB	Orquioepididimitis Infecciosa del Borrego
OIC	Orquioepididimitis Infecciosa del carnero
Omp`s	(Outer Membrane Proteins) Proteínas de Membrana Externa.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pg	Picogramos
PMN	Polimorfonucleares.
nm	Nanómetros
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de lauril dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SSF	Solución Salina Fisiológica
Tc	Linfocito T cooperador
Th1	(T helper 1) Linfocitos cooperadores T tipo 1
Th2	(T helper 2) Linfocitos cooperadores T tipo 2
UFC	Unidad Formadora de Colonias.
U	Unidades
WB	(IET) Inmunoelctrotransferencia.
µg	Microgramo
µm	Micrómetro

I. Introducción

1.1 Generalidades de la epididimitis.

Para todo criador de ovinos y/o de caprinos, la salud de sus reproductores es decisiva y de gran importancia económica, ya que de ello dependerá que queden o no preñadas las hembras y por consiguiente aumentar o disminuir el número de cabezas en su ganado (Robles, 1990, Lozano, 1986).

La epididimitis¹ se ha identificado como una enfermedad infecciosa, contagiosa, progresiva e irreversible, de curso agudo a crónico, de presentación clínica o subclínica; caracterizada por la inflamación del epidídimo, que ocasiona secundariamente degeneración testicular, infertilidad y finalmente esterilidad del semental (Bagley, 1997; Palomares, 2003).

La orquiepididimitis Infecciosa del Borrego (OIB) y del camero (OIC) es un grave problema que afecta considerablemente a los productores de todo el mundo (Hafez, 1993, Low, 1995; Mbai, 1996; De la Puente- Redondo, 2000).

La OIC es de gran trascendencia debido a la esterilidad que causa en el rebaño, (Walker., 1986; Appuhamy, 1998) causando disminución en el número de reemplazos disponibles y los gastos de manutención de cameros y hembras estériles (Genetzky, 1995; Walter y col, 1986).

¹ Epididimitis: también se le conoce como orquiepididimitis la cual se define como una infección en testículo y del epidídimo, con presentación aguda ó crónica, que provoca engrosamiento y adherencia de las serosas parietal (vaginal en hembras), detectables clínicamente. (Nicolet, 1985).

1.1.2. Etiología de la epididimitis.

El agente etiológico de la epididimitis ovina ha sido asociado principalmente a *Brucella ovis* por ser el agente aislado con mayor frecuencia, su epidemiología y patogénesis esta bien documentada (Biberstein, 1964; Brown et al, 1973; Walker, 1986); sin embargo, en el estudio de muestras de animales infectados con epididimitis se sabe actualmente que *B. ovis* no es el único microorganismos capaz de producir la enfermedad, también puede ser causada por una variedad de bacilos pleomórficos gram negativos (BPGN) que se han clasificado en dos grupos: ***Histophilus ovis*** y ***Actinobacillus spp.*** (Burguess, 1982: Walker., 1986; Genetzky, 1995). (CUADRO 1)

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

En el grupo *Actinobacillus spp.*, se encuentran un grupo de bacilos causantes de lesiones en testículo y epidídimo que tienen propiedades diferentes que los caracteriza, y cuyos representantes son *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, otros microorganismos similares pertenecen al grupo *Actinobacillus* grupos A y B (*Actinobacillus like*), todos estos son bacilos no esporulados, inmóviles, no ácido resistentes y no hemolíticos. (Baynes and Simons 1960; Baynes and Simmons, 1966; DeLong, 1979; Neath, 1990) (CUADRO 1)

Otros microorganismos relacionados con la etiología de la epididimitis son *Archaneabacterium pyogenes*. (Egerton, 2000), *Bacteroides spp.* (Ekdahl., 1968), *Corynebacterium pyogenes* (Watt, 1966), *Manhemia haemolytica* (Fodor,1984), *Moraxella spp.* (Fodor, 1984), *Pasteurella multocida* (Ekdahl, 1968) *Staphylococcus spp.* (Watt, 1970); *Streptococcus spp.* (Watt, 1970). (CUADRO 1)

Por pruebas bioquímicas no se puede establecer un diagnóstico definitivo y determinar cual es el agente involucrado debido que al tomar muestras se pueden hallar más de uno, y las pruebas no son características diferenciales entre los géneros involucrados en casos de epididimitis. (Brown, 1973; Burguess, 1983) (CUADRO 2)

Sin embargo se han identificado como principales causantes de la epididimitis a *Brucella ovis* (Oviedo, 1988).y *Actinobacillus seminis* y *Haemophilus somni* (CUADRO 1 y 2). (Van Tonder, 1979; Nicolet, 1985; Baynes and Simmons, 1960, Baynes and Simmons, 1966). (CUADRO 1)

Tabla 1. Agentes etiológicos de la epididimitis.

AGENTES CAUSANTES DE EPIDIDIMITIS	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Brucella ovis</i>* (Buddle, 1956) 	
GRUPO <i>Histophilus ovis</i>	GRUPO <i>Actinobacillus spp</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haemophilus somnus</i> (Robles, 1998) • <i>Haemophilus somnus</i> (Miller, 1983) (<i>Histophilus somni</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinobacillus seminis</i>* (Baynes and Simons 1960; Baynes and Simons, 1966) • <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (DeLong, 1979) <p style="text-align: center;"><i>Actinobacillus</i> GRUPOS A Y B</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Actinobacillus like</i> (Neath, 1990)
OTROS	
<ul style="list-style-type: none"> ❖ <i>Archaneabacterium pyogenes</i>. (Egerton, 2000) ❖ <i>Bacteroides spp.</i> (Ekdahl y col., 1968) ❖ <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (Belonje, 1972) ❖ <i>Corynebacterium pyogenes</i> (Watt, 1966) ❖ <i>Escherichia coli</i> (Cornick, 2000) ❖ <i>Manhemia haemolytica</i> (Fodor, 1984) ❖ <i>Moraxella spp.</i> (Fodor, 1984) ❖ <i>Pasteurella multocida</i> ❖ <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> (Ekdahl y col., 1968) ❖ <i>Staphylococcus spp.</i> (Watt, 1970) ❖ <i>Streptococcus spp.</i> (Watt, 1970) 	

Tabla 2. **Propiedades Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con la epididimitis ovina.**

(Bergey, 1984)

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	<i>Brucella ovis</i>	<i>Actinobacillus seminis</i>	<i>Histophilus ovis</i>
Catalasa	+	-/+	-
Motilidad	-	-	-
Hemólisis	-	-/+	-
Nitratos	-	-	+
Oxidasa	-	-	+
Indol	-	-	-/+
Urea	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Voges- Proskauer	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Xilosa	-	-	+
Glucosa	-	-	+
Fructosa	-	-	+
Galactosa	-	-	-
Sucrosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Trealosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Manitol	-	-	-/+
Sorbitol	-	-	-/+
Gelatina	-	-	-
Maltosa	-	-	+
Gram	-	-	-
Ziehl-Neelsen	-	-	-
Ziehl-Neelsen <i>Modificación de Stamp</i>	Cocobacilos de color rojo	Cocobacilos de color azul	-

Esta variedad de agentes etiológicos de la epididimitis algunos forman parte de la flora normal de la mucosa bucal, nasal, prepucial y peneana de los ovinos machos, y por causas no muy bien aclaradas pueden agredir y enfermar a estos animales de edades comprendidas entre la pubertad y los 18 meses, llegando hasta los 2 años la edad máxima de los afectados, siendo siempre animales que se han criado separados de carneros adultos y ovejas adultas (Nicolet, 1985; Palomares, 2003; Walker, 1986).

Debido a la variedad de los agentes etiológicos involucrados en la epididimitis y de sus diferentes características patogénicas, que son capaces de inducir lesiones en el epidídimo y testículo no pueden ser diferenciados por palpación y/o cuadro clínico (Bagley, 1997; Burgués, 1982).

1.2 Antecedentes de *Actinobacillus seminis*.

Actinobacillus seminis (*A. seminis*) es el agente causal de la epididimitis, poliartritis en corderos y abortos en borregas; también se ha aislado del tracto genital de ovinos clínicamente sanos (Méndez, 1996, Lozano, 1986). La presencia de este microorganismo como causante de epididimitis se ha comprobado en diferentes países.

A. seminis fue identificado por primera vez en Australia como agente causal de epididimitis en donde, se describieron 3 casos de epididimitis, encontrando en muestras de semen y epidídimo una bacteria que no se encontraba reportada, a la cual asigno dentro del género *Actinobacillus* por las características morfológicas, y *seminis* debido a que se encontró en muestras de semen (Baynes y Simmons, 1960). Se han reportado a partir de casos de epididimitis donde se ha corroborado la presencia de *Actinobacillus seminis* en Europa, Nueva Zelanda (Ekdahl, 1968), Estados Unidos de Norteamérica en Texas (Livington y Hardy, 1964), Sudáfrica (Van Tonder, 1973; Van Tonder, 1979), Reino Unido (Heath y col., 1991), Kenia (Mbai, 1996) y más recientemente en España (De la Puente Redondo, 2000).

En Argentina se realizó el primer aislamiento en 1989 en la Patagonia, en borregos con muy buen nivel nutritivo. (Robles y col., 1989).

En México se encuentran reportes que se aisló en 1986 del epidídimo de un carnero del Estado de Hidalgo, posteriormente en 1988 en el Estado de México (Oviedo, 1988; Méndez, 1996). Recientemente en México se encuentra afectando a la industria ovina mexicana por encontrarse distribuida en la región Central de México ya que se aísla la bacteria, comprobando la existencia de identidad antigénica con una cepa de referencia al realizar pruebas de inmunodifusión doble en gel (IDD) (Méndez, 1996; Méndez y col., 1999).

La infección por *A. seminis* produce un impacto negativo en todos aquellos países donde la cría del ovino es una actividad económica importante. Esto se debe a una caída en la fertilidad, un aumento en el descarte de carneros infectados, acortamiento de la vida reproductiva de los machos, abortos, aumento de la mortalidad perinatal, complicaciones en el manejo y restricciones en el comercio (Méndez, 1996; Robles, 1989).

1.3 Aspectos microbiológicos *Actinobacillus seminis*.

El género *Actinobacillus* pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, (Pohl, 1981). Esta familia forma parte del grupo HAP que comprende tres géneros de gran importancia a nivel veterinario debido a las patologías que son capaces de causar [*Haemophilus* (Winslow y col., 1917), *Actinobacillus* (Brump, 1910) y *Pasteurella* (Trevisan, 1987)], estos microorganismos se caracterizan por agrupar cocobacilos Gram negativos pequeños, pleomórficos, que viven en las mucosas del hombre y animales (Koneman, 1992) en los aislamientos iniciales, requieren una atmósfera con 5% de CO₂.

Dentro del género *Actinobacillus* se encuentran las siguientes especies:

Tabla 3. **Especies del genero Actinobacillus.**

- | | |
|--|--|
| ❖ <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> | ❖ <i>Actinobacillus minor</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus arthritidis</i> | ❖ <i>Actinobacillus muris</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus capsulatus</i> | ❖ <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus delphinicola</i> | ❖ <i>Actinobacillus porcinus</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus equuli</i> | ❖ <i>Actinobacillus rossii</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus equuli subsp. equuli</i> | ❖ <i>Actinobacillus scotiae</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus equuli subsp. haemolyticus</i> | ❖ <i>Actinobacillus seminis</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus hominis</i> | ❖ <i>Actinobacillus succinogenes</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus indolicus</i> | ❖ <i>Actinobacillus suis</i> |
| ❖ <i>Actinobacillus lignieresii</i> | ❖ <i>Actinobacillus ureae</i> |

, etc

A. seminis es un microorganismo gram negativo, inmóvil, no presenta esporas, pleomórfico y en forma de cocos o cocobacilos que miden de 1 µm X 4.5 µm, ordenados individualmente, en pares o pequeñas cadenas, son anaerobios facultativos su temperatura optima de crecimiento es de 37° C con una atmósfera de 10% de CO₂, para su cultivo “*in vitro*” se requiere de medios enriquecidos con sangre o suero fetal bovino del 5 al 10%. Luego de las 24 horas se observan colonias del tamaño de la cabeza de un alfiler, a las 48 horas alcanza el diámetro de 1 a 2 mm, poseen color gris blanquecino, convexas, redondeadas con márgenes enteros, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor (Burguess, 1982; Sneath y Stevens, 1990). Las características bioquímicas no son de gran ayuda en la identificación de *A. seminis* debido a que comparte características bioquímicas con microorganismos que se encuentran colonizando la zona afectada. (CUADRO 2). En estudios de microscopia electrónica no se observan esporas, cápsula o pilis (Sponenberg y col., 1983).

1.4 Patogénesis de epididimitis causada por *A. seminis*.

A. seminis ha sido aislado en un 13.8% en carneros que no presentan lesiones clínicas en el epidídimo ni en el testículo, ausencia de neutrófilos en el semen, por lo que se considera que la infección se encuentra en estado latente, adquiriendo estos animales la condición de portadores asintomáticos, en muchas ocasiones se ha logrado el aislamiento bacteriano de vesículas seminales con apariencia normal (Van Tonder, 1979; Jansen, 1980).

Estos datos sugieren que la presencia de los microorganismo causantes de la epididimitis no es indicativa de enfermedad, ya que son muy abundantes en mucosas de animales sanos y enfermos; sin embargo, aún no se sabe porqué algunos enferman y otros no. Propone que los máximos niveles de gonadotropinas hipofisarias en sangre favorecen y que la epididimitis probablemente se produce por la colonización de los bacilos en los tejidos intersticiales a los que llegan por la erosión de las capas epiteliales de los ductos eferentes y epididimarios, lo que desencadena una inflamación aguda con arribo de leucocitos y macrófagos, liberación de histamina y escape de espermatozoides al tejido erosionado y la orquioepididimitis clínica. (Jansen, 1980; Livingston y col., 1964). En muestras de semen de carneros afectados por *A. seminis* se encuentra una disminución de volumen del eyaculado de 0.5 ± 0.23 en comparación con los carneros sanos que es de 0.8 ± 0.17 ml. La concentración espermática es de 260×10^6 /ml contra 1850×10^6 /ml (Low y col., 1995; Mbai y col., 1996).

1.5 Patogenia de *A. seminis*.

La patogenia de la epididimitis es incierta debido a que los agentes que la ocasionan son parte de la flora normal del animal afectado (Burguess, 1982). Jansen sugiere que *A. seminis* es un microorganismo ambiental que invade la cavidad prepucial y es capaz de ascender hacia las paredes del tracto genital. (Jansen, 1983). Walker y Leamaster, lo presentan como un habitante normal de las mucosas del borrego, y por causas no muy bien aclaradas pueden agredir y enfermar a animales jóvenes comprendidos entre la pubertad y 18 meses, llegando hasta los 2 años la edad máxima de los afectados, siendo siempre animales que se han criado separados de carneros adultos ú ovejas adultas. (Robles y col., 1989; Oviedo, 1988; Méndez y col., 1999; Walker y col., 1986). *A. seminis* es extremadamente contagioso y comúnmente se aísla a partir de carneros “sementales”, que comparten el mismo corral, y en ocasiones montan a la misma oveja que puede ser una fuente importante en la transmisión de la enfermedad. (De la Puente Redondo, 2000).

La epididimitis es una enfermedad de gran difusión durante la temporada reproductiva, por lo que ésta es una etapa importante, en la diseminación de la enfermedad. También se puede transmitir de un carnero a otro cuando se olfatean ó se contaminan con orina al reconocerse ó andar juntos. (Acosta, 2001, Jansen, 1983). Otro modo de transmisión es el uso de carneros para el celo, los cuales pueden llevar la infección de uno a otro y de ellos a los carneros padres a través de la oveja marcada en celo. (Nicoletg, 1985). El carnero afectado tiene libido normal, y la calidad del semen, aunque variable, suele ser regular ó mala. Su fertilidad suele estar disminuida, pero puede ser normal, aunque está relacionada con la gravedad de las lesiones epididimales y testiculares. (Acosta, 2001).

Como es una enfermedad de borregos vírgenes, no se debe considerar la epididimitis como una enfermedad venérea, y se cree que puede ser congénita ó contraerse durante la lactancia ó del medio ambiente contaminado. (Jansen, 1980). Hay otras vías de infección no aclaradas ya que se han reportado en ovejas vírgenes; así como también se ha comprobado infección en borregos vírgenes que han sido criados en forma aislada. (Jansen, 1980). Se ha podido aislar la bacteria a partir de las 12 semanas de vida alcanzada su máximo a las 20 semanas, para luego caer al año de edad; Jansen estudio la importancia que tiene el nivel hormonal en la migración de los microorganismos de las partes superficiales del aparato reproductor (mucosa peneana) a las profundas (epidídimo y testículo), los cambios producidos al llegar la pubertad son de gran importancia debido a los cambios que provocan en las células del epitelio epididimal permitiendo la migración de los bacilos (Jansen, 1983), Sponenberg menciona que es poco probable la infección ascendente, por no aislar el microorganismo en glándulas anexas (Sponenberg, 1983).

Con relación a la adhesión esta se realiza a las células epiteliales y es esencial para la virulencia de algunas bacterias, para establecer la infección se requiere una asociación entre las adhesinas de superficie y receptores celulares, en el paso inicial en la patogénesis de muchas enfermedades, Healey demostró la adhesión de *A. seminis* a células renales y la inhibición de estas con anticuerpos monoclonales específicos, por lo tanto sugieren que es posible que *A. seminis* se adhiere al epidídimo por adhesinas que se asocian a los receptores específicos de las células epiteliales del hospedero causando epididimitis en carneros vírgenes, también se sugiere que pueden existir animales que carecen de estos receptores, como se ha demostrado en cerdos. (Healey, 1991).

No se ha reportado existencia de toxinas de *A. seminis* que sean responsables del cuadro clínico. Es importante saber si se encuentran debido a la relación con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* los cuales si las producen (Korostoff y col., 1998). Se han presentado casos de transmisión en borregos que aparecieron infectados después de la monta, con ello es importante la hembra como fuente de infección y diseminación de la enfermedad (Molina Sánchez D, 1985). La oveja que es montada por un borrego infectado puede desarrollar una cervicitis y vaginitis mucopurulenta de poca importancia que no interfiere con la concepción, aunque se han involucrado en brotes de abortos y casos de mortalidad perinatal, ya que se han aislado estos bacilos de los fetos abortados y de descargas vaginales (Swift, 1982; Simmons, Baynes, Ludford, 1966). El carnero adulto podría ser un agente mecánico en la difusión de la enfermedad, infectando ovejas que podrían enfermar a borregos que las montan en el mismo celo. (Robles y col., 1990). También la orina de estos borregos contiene gran cantidad de los bacilos de *A. seminis* causantes de la enfermedad. (Walker y col., 1986).

1.6 Signos clínicos de la epididimitis.

La epididimitis causada tanto por *Actinobacillus seminis* como por *Haemophilus-Histophilus* puede tener una presentación clínica ó subclínica. La epididimitis subclínica sólo se puede diagnosticar por cultivos de semen y/ó de orina, al encontrar los bacilos en ambos fluidos que se caracteriza por altos niveles de neutrofilos en semen. (Sponenberg, 1983).

La epididimitis clínica se puede presentar en forma aguda, con una intensa inflamación del escroto, el cual se encuentra aumentado de tamaño, tumefacto, caliente y doloroso; la cual usualmente desaparece después de 14 días, pero la muerte puede ocurrir en carneros jóvenes (Jansen, 1983; Low, 1995; Sponenberg, 1983).

El borrego afectado está muy decaído, con elevación de temperatura, anorexia, se resiste a caminar ó lo hace con los miembros posteriores muy separados ó con rengueras y envarado.

Después de uno o dos días, al revisarlos cuidadosamente se encuentran adherencias de las serosas bien evidentes, el epidídimo se palpa agrandado y firme, especialmente en la cola, y en pocas horas se instala una fibrosis en la cola del epidídimo y pueden aparecer granulomas espermáticos y abscesos. Los abscesos son más comunes cuando los bacilos causantes de la infección son los del grupo *Histophilus-Haemophilus* y no por *A. seminis* (Walter, 1986; Jansen, 1983).

Muchas veces el testículo adyacente se atrofia, degenera y se encuentran fístulas que dejan salir una secreción purulenta ó se han secado y quedan cicatrices. Con respecto a la calidad del semen, se caracteriza por una baja concentración de espermatozoides, de escasa movilidad y vigor con abundantes formas anormales y alto número de leucocitos, los que frecuentemente contienen bacilos, que también pueden verse en los extendidos de semen formando cadenas ó empalizadas (Sponenberg, 1983). El sitio de lesión más frecuente en casos de epididimitis en carneros maduros es la cola del epidídimo (86.4%). En borregos de alrededor de un año de edad, las lesiones se presentan con mayor frecuencia en la cola (58.9%) que en la cabeza del epidídimo (32.3%). Cuando la lesión se localizo en la cabeza del epidídimo el agente etiológico comúnmente no fue demostrado correspondiendo en muchos casos a granulomas espermáticos, que podrían tener su origen en conductos eferentes aberrantes (Walker, 1986).

1.7 Diagnóstico de *A. seminis*.

El diagnóstico se establece con base a una correcta anamnesis, examen clínico, y estudios bacteriológicos (Baynes y Simmons, 1968; Genetzky, 1995), los cuales se deben realizar en forma periódica, principalmente un control durante la pubertad y en época de celo (monta y después de la monta). (Appuhamy, 1998).

La epididimitis subclínica sólo se puede diagnosticar por cultivos de semen, orina ó por la demostración de los bacilos en un extendido de semen fijado y coloreado con hematoxilina-eosina. La sospecha del trastorno aparece cuando los resultados de preñez en ovejas servidas por ese borrego son malos, ó cuando sorpresivamente en un examen seminal de rutina se encuentra evidencias en el semen de un borrego que no tiene síntomas de padecer ninguna enfermedad. En estos frotis aparecen gran número de leucocitos, lo que se considera indicador de enfermedad subclínica, aunque no se vean los bacilos gramnegativos (Genetzky, 1995).

Se ha encontrado un alto porcentaje de borregos con un número variable de leucocitos en semen pero sin lesiones clínicas, estos animales tienen baja calidad seminal, pero unos pocos meses después estos mismos animales presentan fertilidad normal, los leucocitos disminuidos y las cadenas de bacilos y la calidad del semen se normaliza. Sólo del 1 al 5% de los borregos con epididimitis subclínica se transforman en casos clínicos, el animal afectado se encuentra deprimido, con elevación de la temperatura y se niega a caminar. Se pueden encontrar abscesos cerrados o que drenan al exterior un material cremoso e inodoro.

Siempre hay atrofia testicular con disminución de tamaño y consistencia en comparación con el testículo adyacente (Sponenberg, 1983).

El semen se observa en platina caliente a 37° C y se ven muy pocos espermatozoides con poco vigor y motilidad y muchos leucocitos neutrófilos y bacilos. Al cortar transversalmente el testículo, la superficie de corte es de consistencia blanda, deprimible, é incluso se desintegra fácilmente entre los dedos; pueden encontrarse abscesos intratesticulares.

Son lesiones granulomatosas, crónicas, con degeneración del parénquima y no se ven espermatozoides en los ductos epididimarios (Jansen, 1983).

El estudio bacteriológico se basa en siembra de cola, cuerpo y cabeza del epidídimo así como de los testículos, se emplean medios ricos con sangre o suero ya que su crecimiento se ve favorecido, se incuban a 37° C por un lapso de 2 días en 10% de CO₂ (Acosta, 2001; Genetzky, 1995; Palomares, 2003). La identificación de este organismo se ha dificultado debido a que la zona afectada se encuentra habitada por un grupo de bacterias asociadas como parte de la flora normal que presenta morfología y propiedades bioquímicas parecidas. (Walker, Leamaster, 1986). (CUADRO 2)

Tabla 4 **Diagnostico diferencial de *A.seminis***

PRUEBA	AÑO	ANTIGÉNO (Ag)	REACCION CRUZADA
Fijación del complemento (F.C.)	Rehaley. 1978	Células inactivadas por autoclave	<i>B. ovis</i> <i>H. ovis</i>
ELISA indirecta	Cárdenas y col., 1986	Células sonicadas	Falsos positivos. <i>B. ovis</i> Falsos negativos.
ELISA indirecta	Takes y col., 1990	Células sonicadas	<i>B. ovis</i>
Inmunodifusión doble (I.D.D.)	Méndez y col., 1996	Antígeno soluble	<i>B. ovis</i>
PCR	Appuhamy, 1998	ADN amplificado	-

1.7.1 .Otras patologías parecidas a la epididimitis.

En primer lugar, la orquiepididimitis afecta a borregos desde los 12 hasta los 18 meses de edad, llegando como máximo a los 2 años de edad, y en cambio la brucelosis genital es una enfermedad de carneros adultos, tanto que el porcentaje de carneros enfermos aumenta con la edad. Esta es una importante diferencia epidemiológica. (Lozano, 1986)

En segundo lugar, la serología: los borregos afectados por OIB son negativos a brucelosis.

Por último, los cultivos de semen aclaran cualquier duda.

La frecuencia de casos clínicos es del 1 al 3% y siempre afecta a los borregos de mejor nivel nutritivo dentro del rebaño pero hay un alto porcentaje de borregos del mismo rebaño que excretan leucocitos y bacilos en el semen sin desarrollar enfermedad (Sponenberg., 1983; Jansen, 1983).

Se debe diferenciar la epididimitis del espermatocoele, que es la aplasia de los ductos espermáticos, agrandamiento e induración de la cabeza del epidídimo y se puede confundir con la epididimitis, pero no tiene el componente doloroso, la hipertermia, el decaimiento general ni las rengueras, ni mucho menos la apariencia microscópica de un eyaculado de un borrego enfermo de epididimitis.

La varicocele se le define como un trastorno circulatorio local en las venas del cordón testicular, dilatación sacular y trombosis en la vena espermática interna con una gran hinchazón e induración dentro del cordón y puede ser uni ó bilateral, é interferir directamente en la fertilidad de un borrego porque provoca alteraciones testiculares por insuficiente drenaje de sangre venosa y aumento de presión intraescrotal. El varicocele es causante de que los cordones testiculares estén agrandados y con deformaciones redondeadas y firmes, y los testículos se encuentren grandes pero sin el tono normal, flácidos.

Dentro de las venas dilatadas se encuentran trombos y congestión, la que llega al interior de los testículos, los que están friables, congestionados y severamente afectados. La fertilidad de estos animales es prácticamente cero. También puede producirse una epididimitis traumática con diversos grados de lesión de los ductos espermáticos y epididimarios, incluso con liberación de células espermáticas (Lozano, 1986).

1.8 Importancia antigénica de *A. seminis*.

La epididimitis de los cameros ha sido asociada principalmente a infección por *A. seminis* y *Brucella ovis*. La patogenia de la enfermedad causada por *A. seminis* ha sido poco explorada. En la actualidad es importante conocer cuales son los mecanismos de patogenicidad que lleva a cabo *A. seminis*, así como desarrollar metodologías que permitan diferenciar a cada uno de los microorganismos involucrados en la epididimitis. En estudios de perfiles de proteínas de membrana externa por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se encontró homogeneidad en las bandas *A. seminis* (ATCC 15768), y un aislamiento de campo realizado en Australia, los perfiles de proteínas de membrana externa de *Haemophilus ovis* e *Haemophilus agni* fueron similares, pero no idénticos a los de *A. seminis* (Stephens, 1983). A pesar de pertenecer a la misma familia *Pasteurellacea*, esta diferencia nos da una pauta para buscar alternativas de tratamientos en forma específica para los diferentes géneros bacterianos causantes de cuadros de epididimitis.

1.8.1 Importancia de la proteína de 75 kDa de *Actinobacillus seminis*. (Núñez y col., 2006)

Células completas y fracciones celulares (membrana externa, membrana interna y citosol) de *A. seminis* fueron sometidas a corrimiento electroforetico en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), posteriormente fueron transferidas a papel de nitrocelulosa y se enfrentaron a un suero hiperinmune de conejo contra *A. seminis*, *Brucella ovis*, *Manhemia haemolítica* y *Pasteurella multocida*, mostrando que la proteína de 75 kDa es específica e inmunogénica exclusiva de *A. seminis*, la cual esta presente en membrana externa. (Hidalgo, 2003).

La identificación de una proteína específica e inmunogénica de *A. seminis* es de gran importancia ya que esta puede ser completamente purificada y usarse como antígeno en el desarrollo de una prueba diagnóstica de tipo serológico que identifique la epididimitis ovina producida por esta bacteria. (Núñez. 2005; Núñez y col., 2006).

1.9 Respuesta Inmune (IL-2, IFN- γ e IL-4).

El sistema inmunitario es una red intrincada a lo largo de todo el cuerpo en la participan diferentes tipos de células y moléculas, que tienen como objetivo defender contra los ataques de invasores extraños. La acción coordinada de todos sus elementos permite reconocer la entrada en el organismo de compuestos ajenos al mismo y realizar, o facilitar, el proceso de su eliminación. Las interleucinas son moléculas que regulan la proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune. Estas moléculas se liberan tras activación de linfocitos, proceso en el cual la célula del sistema inmune interacciona con el antígeno y se desarrolla en el interior de la misma una serie de modificaciones bioquímicas que dan lugar a la síntesis de proteínas intercelulares, de membrana y secretoras; posteriormente, las interleucinas se unen a los receptores de membrana dando lugar a la blastogénesis, producción de células efectoras y secreción de nuevas interleucinas (Korostoff, 1998).

Recientemente, los estudios con Interleucinas (Citocinas) han cobrado gran importancia por su posible participación en la fisiopatología de diferentes enfermedades, lo que permitirá establecer nuevas y selectivas modalidades terapéuticas. (Adams, 1997 y Barrett, 1997).

Las interleucinas como respuesta a una agresión bacteriana han sido ampliamente demostradas.

Su producción en el mismo lugar de la infección, precede incluso a la aparición de la fiebre, la síntesis de las proteínas de la inflamación y la respuesta de los neutrófilos. La IL-2, que “*in vitro*” ha demostrado potenciar la proliferación maduración de linfocitos Th1 e IL-4 a los linfocitos Th2. Tanto IL-2 como IFN- γ cuyo efecto principal es inducir la presentación antigénica en las APC (Rosenberg, 1989.) Por lo anterior es de gran importancia la liberación y la función de las interleucinas en el desarrollo de los mecanismos de la respuesta inmune. Se sabe que IL-2, IL-4 e IFN- γ son interleucinas proinflamatorias.

Los estudios que definen la función de las diferentes interleucinas contribuyen al progreso de estas nuevas estrategias en la manipulación de la respuesta inmune. (Barrett ,1997).

(FIGURA 1)

1.9.1 Interleucina 2 (IL-2).

Es una proteína de un peso aproximado de 15 kDa la cual es producida por los linfocitos TCD4+ (Th1), es una interleucina moduladora del sistema inmunitario. Induce la diferenciación de todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos T, principalmente a las células CD8+ (citotóxicas), activa la proliferación de linfocitos B. Interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de IFN- γ , IL-1, TNF- α y TNF- β . La IL-2 es necesaria para la inducción de la respuesta celular. (Fitting C., 1991) (FIGURA 1)

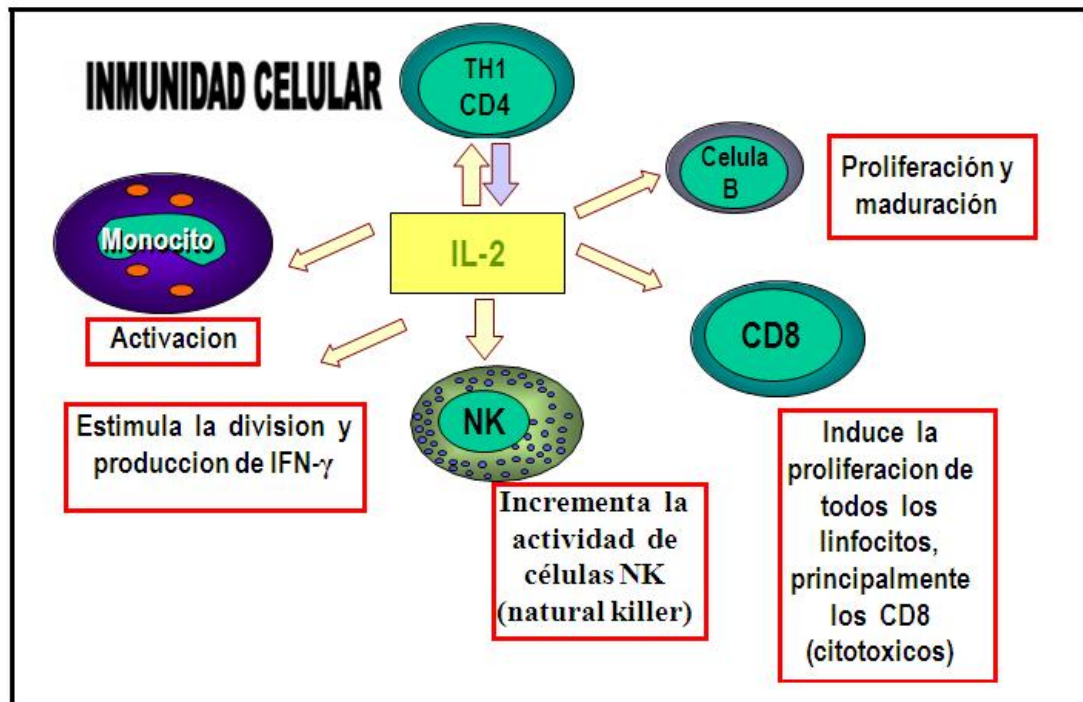


Figura 1. Representación esquemática de la implicación de la liberación de IL-2 (Munoz C, Carlet J, Fitting C., 1991 y Maggi E, Parronchi P, Manetti R., 1992)

1.9.2 Interleucina 4 (IL-4).

Es una molécula de naturaleza proteica tiene un peso molecular aproximado de 20 kDa que es secretada por las células CD4+ (Th2) ayuda a promover la producción de anticuerpos, estimulando la proliferación y maduración de células B, actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6. Promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis. La IL-4 es necesaria para la inducción de la respuesta humoral. (Manetti R., 1992). (FIGURA 1)

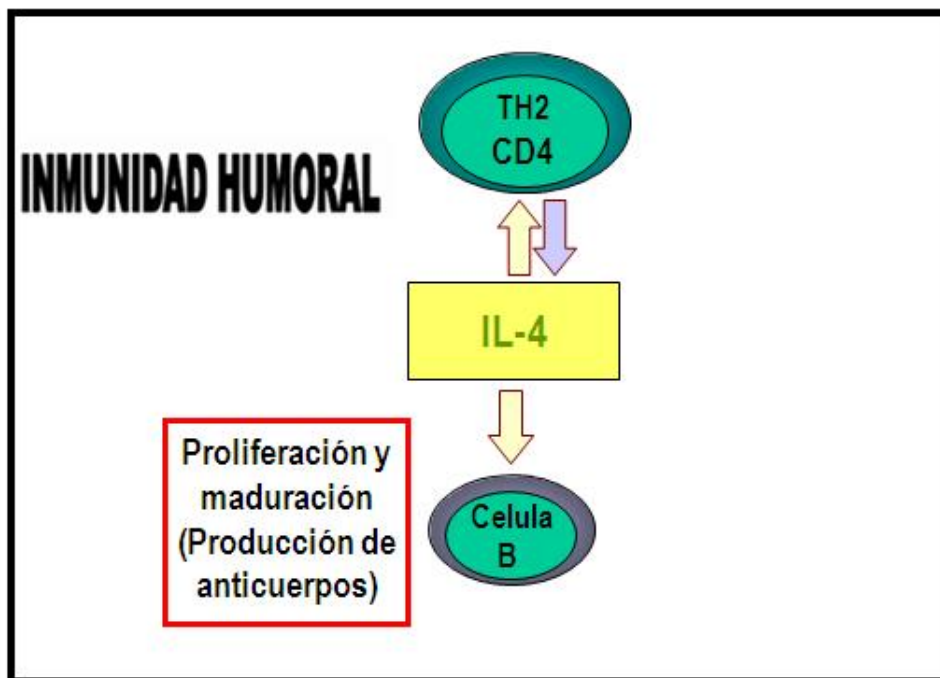


Figura 2. Liberación de IL-4, las células Th2 promueven la diferenciación de las células B en células plasmáticas. (Munoz C, Carlet J, Fitting C., 1991 y Maggi E, Parronchi P, Manetti R., 1992)

1.9.3 Interferón gamma (IFN- γ).

El interferón es una proteína de peso molecular aproximado de 25 kDa (dímero) la cual es producida naturalmente por el sistema inmunitario como respuesta a agentes externos, tales como virus, bacterias, parásitos y células cancerígenas. Secretado por las células CD4+ (Th1). Induce inflamación, su producción es inducida por IL-2. Impide la replicación en células infectadas que aún no han sido destruidas por la acción vírica. Activa linfocitos, NK. El interferón actúa en dos niveles: por un lado evita la replicación vírica en células aún sanas y, por otro lado, favorece la destrucción de las células ya infectadas. (Fitting C., 1991) (FIGURA 1)

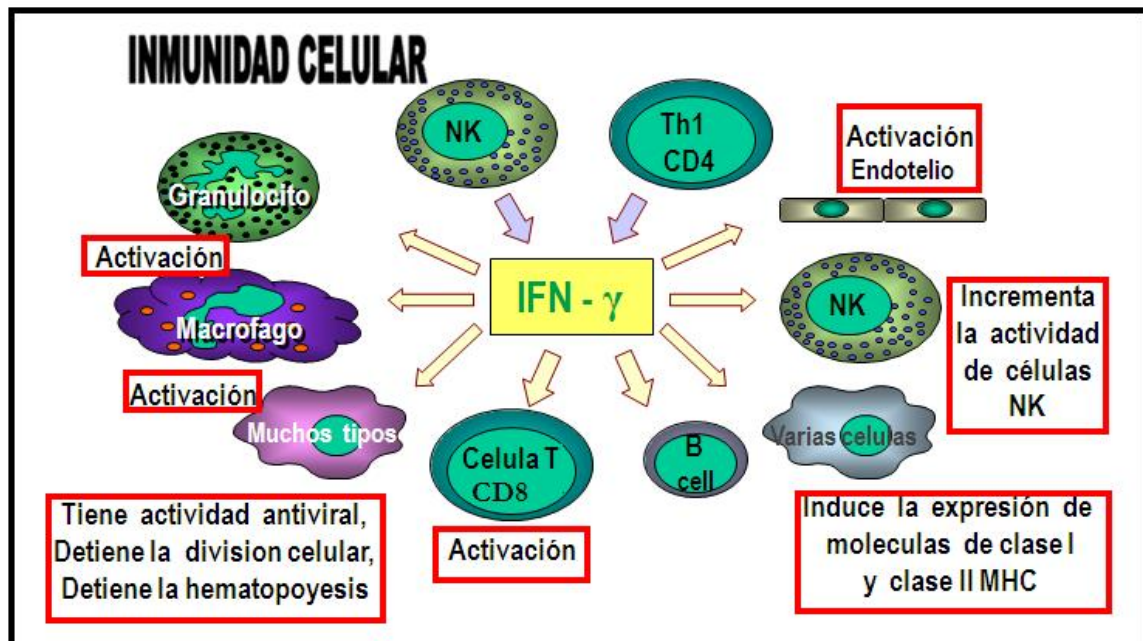


Figura 3 Liberación de IFN- (Munoz C, Carlet J, Fitting C., 1991 y Maggi E, Parronchi P, Manetti R., 1992)

1.9.4 Hipersensibilidad Tardía (DTH; Delayed Type Hypersensitivity).

También denominadas de tipo IV, tipo tuberculina o eccema. En ellas no interviene ningún anticuerpo libre, sino linfocitos T sensibilizados que reaccionan con Ag en el tejido atacando a una célula blanco, liberando Interleucinas y causando la lisis celular. La reacción más típica es la del eccema por contacto: Otras reacciones producidas por este mecanismo son: eccema máculo-papuloso, alergias medicamentosas de tipo tardío, fotoalergia y rechazo de transplantes. Puede haber cuadros clínicos en que aparecen síntomas inmediatos que luego remiten, seguidos de un segundo acceso al cabo de veinticuatro a treinta y seis horas (Adams, 1997)

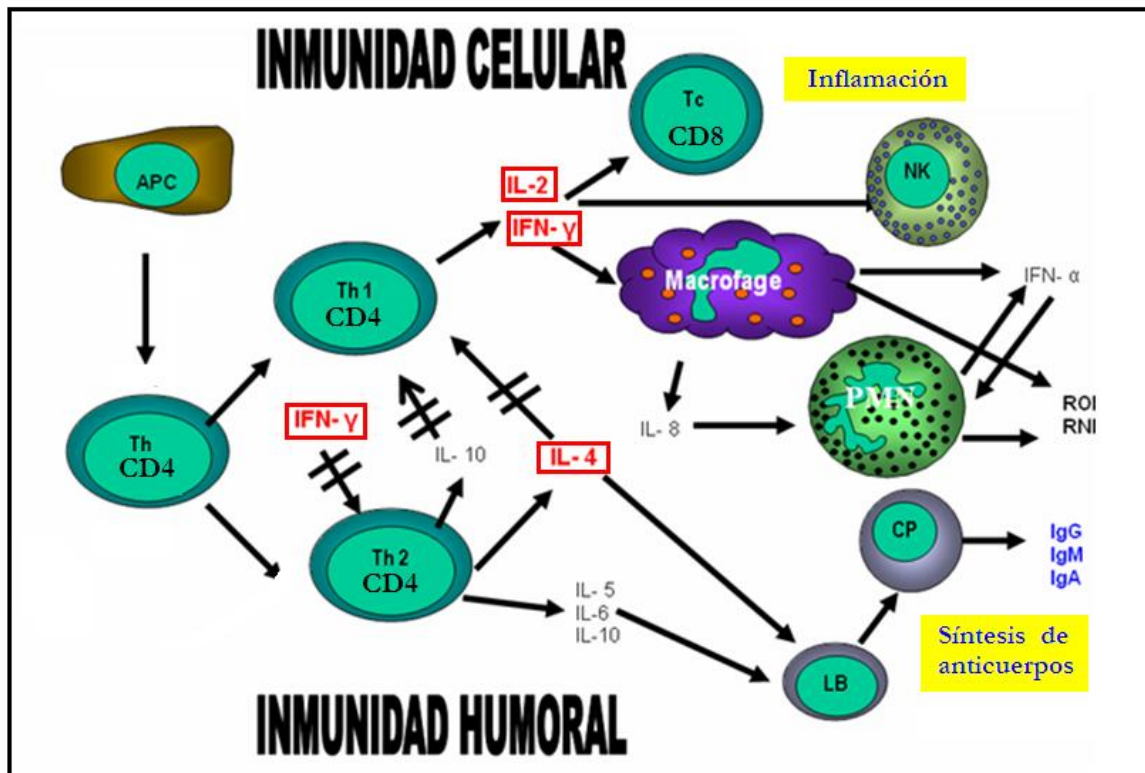


Figura 4. Representación esquemática de la implicación de las células Th1 y Th2 en la respuesta inmune celular y humoral mediante la liberación de interleucinas. Mediante la liberación de IL-2 e IFN- γ , las células Th1 activan los linfocitos Tc y las células NK, mientras que sobre los macrófagos y los PMN (leucocitos polimorfonucleares) Mediante la liberación de la IL-4, las células Th2 promueven la diferenciación de las células B en células plasmáticas. (Munoz C, Carlet J, Fitting C., 1991 y Maggi E, Parronchi P, Manetti R., 1992)

II Justificación

Actinobacillus seminis se ha identificado como el agente causal de la epididimitis contagiosa del borrego (carnero, cordero, oveja), la cual es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que induce un decremento en la fertilidad y finalmente esterilidad; provocando severas pérdidas económicas. Actualmente el desarrollo de métodos de identificación, profilaxis y tratamientos contra los agentes causales de la epididimitis entre los que destaca *A. seminis* ha tomado gran relevancia el empleo de antígenos. Conocer los mecanismos involucrados en la inducción de la respuesta inmune que se activa (Celular, humoral o ambas) al haber infección por *A. seminis*, nos permitirá conocer la patogenia en forma específica de este microorganismo.

III. Hipótesis

Si se utiliza una cepa de *A. seminis* y se inoculan a un grupo de ratones, con la finalidad de inducir una respuesta inmunitaria, al realizar la medición de los niveles de interleucinas como son IL-4, IL-2 e IFN- γ , entonces podremos determinar el tipo de respuesta inmunológica que se activa.

IV. Objetivos.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Medir en cultivo celular la concentración de IL-4, IL-2 e IFN- γ a partir de bazo de ratón, posterior a la inoculación de células completas de una cepa de *Actinobacillus seminis*; para determinar que tipo de respuesta inmunitaria es inducida.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ▶ Obtención de célula completa de *A. seminis* ATCC 15768.
- ▶ Realizar el cultivo celular a partir de linfocitos de bazo de ratón de la cepa Balb/c, previamente inmunizadas con células completa de *A.seminis* ATCC 15768.
- ▶ Cuantificar la concentración de IL-2, IL-4 e IFN- γ , en el sobrenadante del cultivo celular a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas.
- ▶ Determinar la prueba DTH (Hipersensibilidad tipo IV “tardía”) en cojinete plantar de ratón, producida por la célula completa de una cepa *A. seminis*.

V. Material y métodos.

5.1 Preparación de inóculo.

Se utilizó la cepa de referencia de *A. seminis* (ATCC 15768), la cual se mantuvo en placas con Agar Sangre (10%) y Agar Brucella (DIBCO) + sangre (10%) durante 48 horas a 37° C a 10 % de CO₂ (Estufa de CO₂, Thermolyne-Modelo 37900).

5.2 Estudio bacteriológico de *A. seminis*.

A la cepa de referencia de *A. seminis*, se le realizaron las siguientes pruebas bioquímica: citratos, oxidasa, OF (Oxido-Fermentación), motilidad, nitratos, RM (Rojo de Metilo), TSI (Triple hierro azúcar), VP (Voges–Proskauer), LIA (Agar hierro lisina), Producción de H₂S, Catalasa, dejándose incubar 24 horas a 37° C a 10% de CO₂. (Estufa de CO₂, Thermolyne). Se realizaron tinciones para su identificación como fue la de Gram, Ziehl-Neelsen modificada.

5.3 Inmunización con células completas de *A. seminis*.

El inóculo se preparo a partir de crecimiento *A. seminis* en placas con agar sangre cosechándose a las 48 horas en SSF estéril. La concentración del inóculo fue de 2x10⁸ UFC/ml. con una D.O. 0.615 ($\lambda = 450$ nm).

5.4 Protocolo de inmunización.

Se inmunizaron 25 ratones machos de la cepa Balb/c, de 4 a 5 semanas de edad con células completas de *A. seminis*. Antes y después de la inmunización se tomo muestra de sangre y se determino mediante DOT-ELISA la presencia de anticuerpos.

Cada tres días se inocularon por vía intramuscular (IM), un volumen de 0.2 ml, de células completas de *A.seminis* (D.O. 0.615 del inoculo) ($\lambda = 450$ nm); la cual comparada con el estándar 0.5 del Nefelómetro de Mac. Farland corresponde a una concentración aproximada de 2×10^8 UFC/ml.

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

Después de cuatro semanas los ratones (inmunizados cada tercer día), un grupo de 15 ratones fueron sacrificados.

5.5.1 Cultivo celular

Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

- A) Se obtuvieron los bazos de los ratones, para eliminar restos de sangre se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks (HBSS).
- B) Se colocaron en una caja de Petri la cual contenía 10 ml de medio de RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g de estreptomina (GIBCO), y en un pedazo gasa estéril, se envolvieron la cual sirvió como tamiz para retener los restos de tejido.
- C) Con la finalidad de disgregar los bazos se maceraron cuidadosamente con el émbolo de una jeringa estéril
- D) La suspensión celular resultante se colocó en un tubo cónico estéril de 50 ml se adicionaron 10 ml de medio RPMI con antibióticos; se dejó 5 minutos en reposo para sedimentar los restos de tejidos.

-
- E)** Se decanto el sobrenadante a otro tubo cónico teniendo cuidado de no tomar el sedimento ya que son restos de tejido, se centrifugo 10 minutos a $10,000 \times g$ a temperatura ambiente.
- F)** Se decanto el sobrenadante y el botón celular resultante se resuspendió en 1 ml de Cloruro de amonio (Merck) a 0.17M, la suspensión se mantuvo a una temperatura de 4°C por cinco minutos para lisar eritrocitos.
- G)** Después de los cinco minutos la suspensión se centrifugo nuevamente 10 minutos a $10,000 \times g$.
- H)** Se decanto el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 10 ml de medio RPMI con antibióticos; nuevamente se centrifugo 10 minutos a $10,000 \times g$.
- I)** Se elimino el sobrenadante y el botón se resuspendió con 10 ml de medio RPMI con antibióticos; se centrifugo 10 minutos a $10,000 \times g$.
- J)** El botón resultante se resuspendió en medio RPMI con antibióticos, SFB al 20% (GIBCO), L-glutamina 200 mM y aminoácidos 0.1 mM.
- K)** Se tomaron 100 μ L de la suspensión celular, se mezclaron con 100 μ L de azul de Tripán al 10% se realizo el conteo en la cámara de Neubauer.
- L)** Se ajusto la concentración celular a 5.8×10^6 células/ ml.
- M)** A 21 pozos por placa de cultivo celular (Marca Nunc de 96 pozos de fondo plano) se le adiciono 1 ml de la suspensión celular. (Se utilizaron 3 placas)

5.5.2 Inoculación del cultivo primario con células del bazo del ratón.

- A) A 15 pozos de cada una de las placas de cultivo celular (Marca Nunc de 96 pozos de fondo plano) que contenía 1 ml de suspensión celular de bazo de ratón a una concentración celular de 5.8×10^6 células/ml; fueron inoculados con 10 μ l de una suspensión de (2×10^8 UFC/ml) células completas de *A. seminis* para estimular la producción de interleucinas “in vitro”.
- B) Como control positivo se utilizaron 6 pozos por placa, los cuales fueron inoculados con 10 μ l de concanavalina A con una concentración de 5 μ g/ml (Sigma Chemical Co).
- C) Para el control negativo se utilizaron 6 pozos por placa, en los cuales únicamente se utilizaron los sobrenantes del cultivo sin inocular.

La placa se incubó a 37°C a 5% de CO₂ (Estufa, Thermolyne-Modelo 37900). Los sobrenadantes se colectaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-inoculación y fueron congelados hasta su uso (4°C).

5.6 Medición de Interleucinas (IL-2, IFN- γ e IL-4).

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

Tabla 5 Concentraciones empleadas en la medición de Interleucinas

	IL-2	IL-4	IFN- γ
Anticuerpo de captura	2 μ g/ml	4 μ g/ml	4 μ g/ml
Anticuerpo detector	300 ng/ml	200 ng/ml	400 ng/ml
Estándar de Interleucinas [pg/ml]	1000	1000	2000
	500	500	1000
	250	250	500
	125	125	250
	62.5	62.5	125
	31.25	31.25	62.5
	15.625	15.625	31.25
	7.81	7.81	15.625
	3.90625	3.90625	7.81
	1.953	1.953	3.90625
		1.953	

Procedimiento.

- A) Se depositaron 100 μ l/ pozo del anticuerpo de captura a las microplacas (Marca C.T.L. de 96 pozos de fondo plano).
- B) Posteriormente se sellaron las microplacas e incubaron toda la noche a temperatura ambiente.
- C) A las 15 horas se aspiró y lavo cada pozo con amortiguador de lavado (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, filtrado en 0.2 μ m) cada pozo se lleno con 400 μ l y se realizó una perfecta remoción del amortiguador.
- D) Para el bloqueo de la microplacas se realizó adicionando 300 μ l de amortiguador de bloqueo por pozo e incubando a temperatura ambiente una hora. Se aspiraron y lavaron.

-
- E)** Para la realización de la curva estándar se procedió a realizar por triplicado cada una de las interleucinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ) para lo cual se depositaron 100 μ l/pozo del estándar en una microplaca (Marca C.T.L. de 96 pozos de fondo plano).
- F)** En otra microplaca (Marca C.T.L. de 96 pozos de fondo plano) se realizó por triplicado la adición de 100 μ l/pozo de los sobrenadantes obtenidos en el cultivo de bazo ratón que fueron recolectados a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120.
- G)** Las microplacas fueron selladas y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente.
- H)** Pasado el tiempo de incubación las microplacas fueron aspiradas y lavadas con amortiguador de lavado llenando cada pozo con 400 μ l, una perfecta remoción del amortiguador.
- I)** Posteriormente se adicionaron 100 μ l por pozo del anticuerpo detector, se cubrieron las microplacas y se incubaron dos horas a temperatura ambiente, la solución se aspiró y lavo de cada microplaca.
- J)** Finalmente se adicionaron 100 μ l de Streptoavidina-HRP (horse radish peroxidase) a cada pozo, se cubrieron e incubaron por veinte minutos a temperatura ambiente, tratando de evitar el contacto con la luz directa, la solución se aspiró y lavo.
- K)** Para el revelado se adicionaron 100 μ l de solución de sustrato (H_2O_2 + tetrametilbencidina) a cada pozo, se incubó veinte minutos a temperatura ambiente.
- L)** Para detener la reacción se agregaron 50 μ l (H_2SO_4 , 2N) por pozo, se mezcló bien y se realizó la lectura de las microplacas. (ELISA DYNEX MRX Revelation).

5.7 Determinación de Hipersensibilidad tardía (DTH).

- A) A otro grupo de diez ratones Balb/c previamente inmunizados con célula completa de *A. seminis*, se les inocularon 50 µl de una suspensión de la cepa a una concentración 2×10^8 UFC/ml., en el cojinete plantar vía intradérmica.
- B) Se calculo el aumento porcentual de la induración a las 24 y 48 horas en comparación con el grosor de la piel en el momento de inocular 50 µl de PBS en el cojinete del ratón testigo, todas las mediciones fueron tomadas con vernier (Chatelain, 1992).

VI. Resultados.

Todas las bacterias patógenas en cierto grado contienen estructuras que activan el sistema inmune generando respuestas ante el estímulo antigénico, lo que ha permitido conocer los mecanismos que se activan al ingresar al organismo. Al evaluar la producción de interleucinas en el cultivo celular de linfocitos T de bazo de ratón, que previamente fueron sensibilizados con células completas de *A. seminis* (Antígeno), el comportamiento mostrado en los sobrenadantes recolectados a las. 24, 48, 72, 96 y 120 horas podemos observar que en el caso de la IL-2 existe una ligera disminución a las 48 horas: sin embargo, de las 72 a las 120 horas se mantiene estable (TABLA 6 Y GRAFICA 2), en el caso de la IL-4 al igual que la IL-2 observamos una respuesta en general homogénea, existiendo disminución en la inducción a las 72 y 120 horas (TABLA 6 Y GRAFICA 2); e IFN- γ , muestra concentraciones al inicio niveles bajos a comparación de las otras interleucinas: sin embargo, mostró niveles mas altos a las 48 y 120 horas, siendo esta ultima la mas notoria respuesta producida por las interleucinas evaluadas

Tabla 6 Concentración de interleucinas obtenidas en la medición del sobrenadante de cultivo celular de bazo de ratón.

	IL-2	IL-4	IFN- γ
<i>HORAS</i>	<i>[pg/ml]</i>		
24	25,784	32,2806	6,6256
48	19,7104	32,2806	41,9587
72	26,3914	19,8344	11,7122
96	28,0617	39,9854	9,5322
120	26,0877	19,538	78,5648

6.1 Análisis estadísticos para interleucinas.

Se realizó un análisis para evaluar la diferencia estadística entre los valores de concentración de interleucinas obtenidas, mediante la prueba de t-student (bilateral o de dos colas) con un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$) (TABLA 7).

Tabla 7 Análisis estadístico t-student (bilateral) de la medición de interleucinas obtenidas

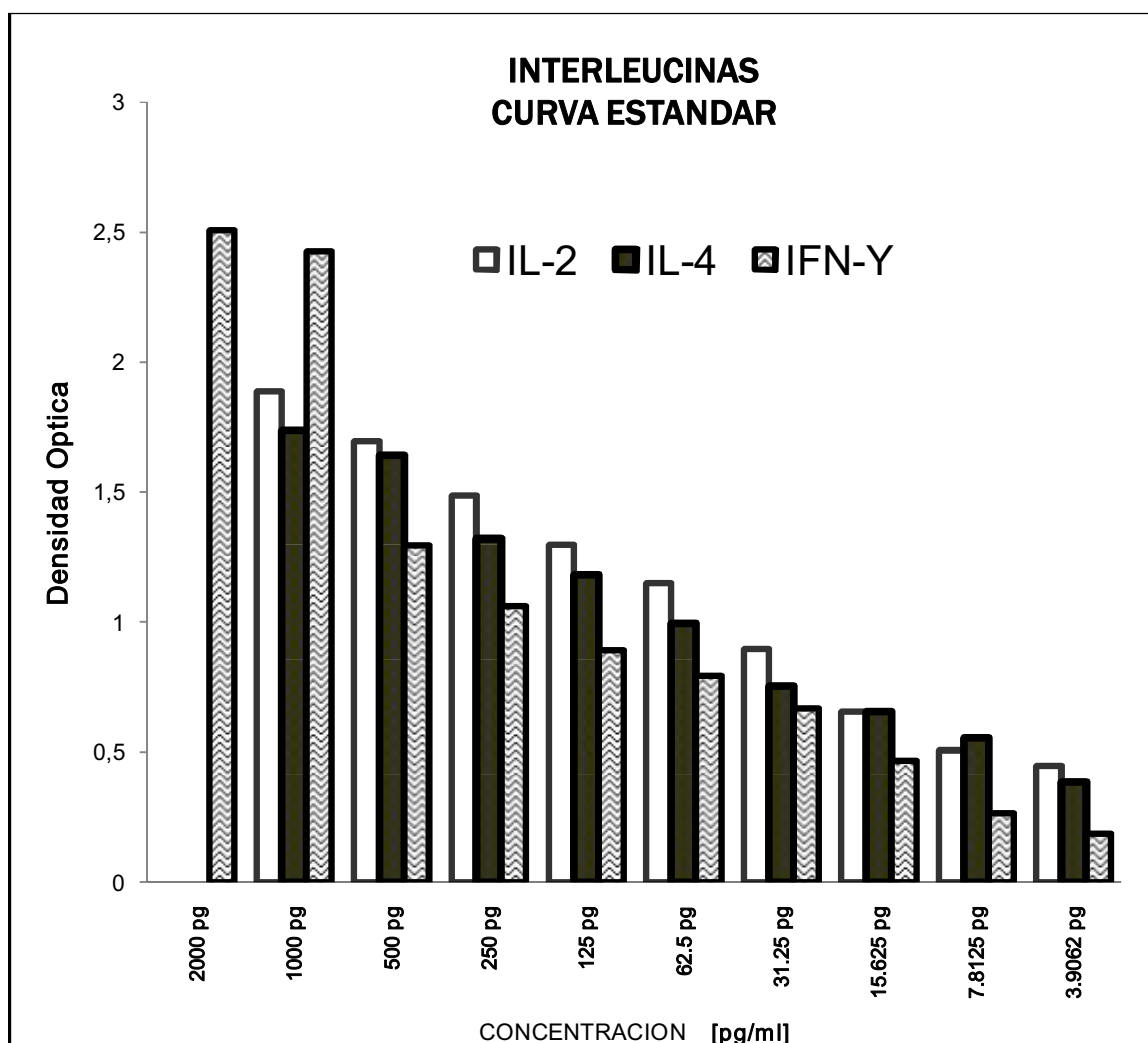
	IL-4	IL-2		IFN- γ	IL-4		IFN- γ	IL-2
	28.78	25.207		29.65	28.78		29.65	25.207
S	8.88	3.19	S	30.78	8.88	S	30.78	3.19
n	5	5	n	5	5	n	5	5
	<p>p=0.4215 t=0.8472 $\alpha=0.05$ (95%)</p>			<p>p=0.9518 t=0.0624 $\alpha=0.05$ (95%)</p>			<p>p=0.7553 t=0.3226 $\alpha=0.05$ (95%)</p>	

La inducción de producción de IL-2 e IL-4, son muy parecidas teniendo ambas un comportamiento muy similar iniciando a las 24 horas con una respuesta elevada, teniendo picos máximos muy parecidos, IL-2 a las 72 horas mientras que IL-4 a las 96 manteniendo una tendencia muy similar ya que ambas disminuyen a las 120 (GRAFICA 2); el análisis estadístico muestra un valor de $p>0.05$, ($p=0.4215$), lo cual nos sugiere que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos entre las interleucinas; por lo tanto el comportamiento es el mismo en ambas. Al comparar IFN- γ e IL-4, se observó que la concentración al inicio de IFN- γ es menor teniendo picos máximos a las 120 horas e IL-4 mantiene niveles por debajo de IFN- γ (GRAFICA 2); sin embargo estadísticamente obtenemos $p>0.05$, ($p=0.4215$), lo cual indica que no hay diferencia significativa entre ambos, se comportan idénticas.

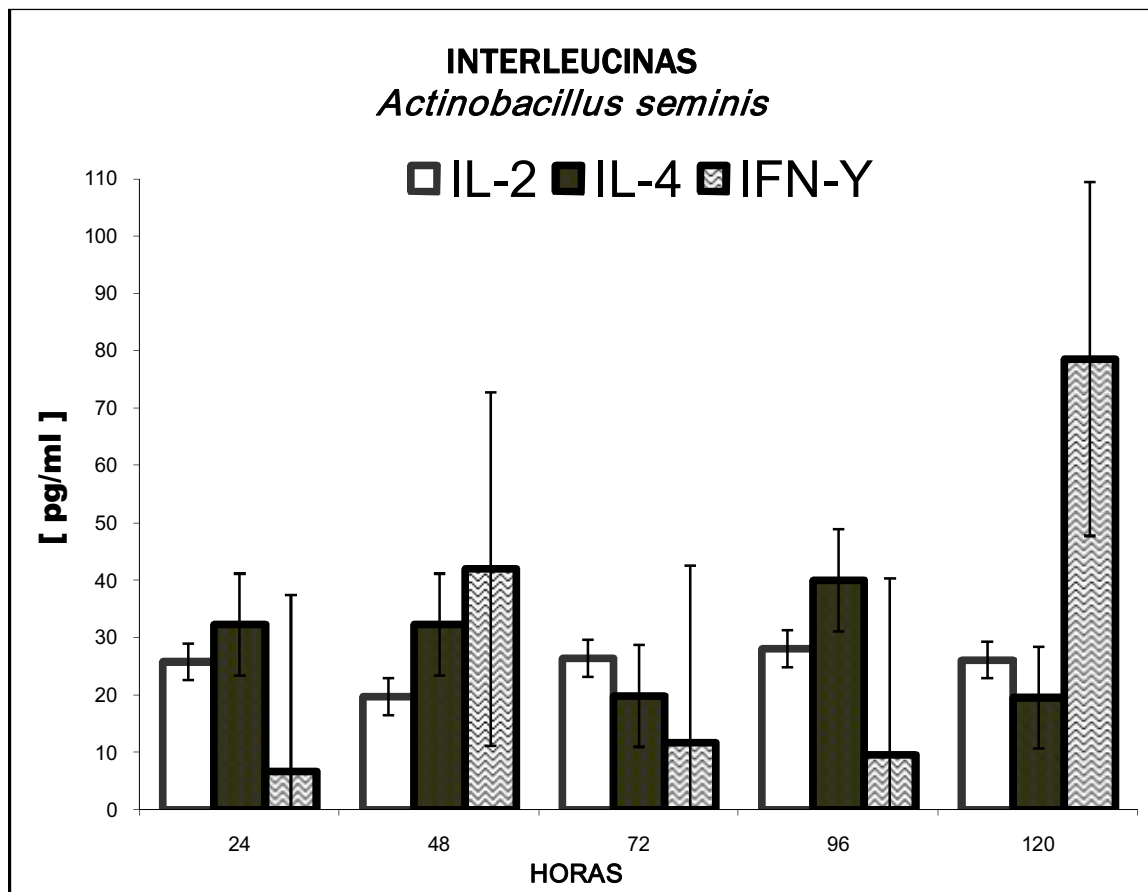
Comparando IFN- γ e IL-2 las concentraciones observadas son muy parecidas a la mostrada con IL-4, que muestran concentraciones mayores que las de IFN- γ , al inicio, las cuales al final se muestran por arriba de las de IL-2 e IL-4, la diferencia estadística entre ambas indica una $p > 0.05$, ($p = 0.7553$), no existe diferencia significativa entre ellas.

Grafica 1. Estándar de IL-2, IL-4 e INF- γ .

A partir de ella se obtuvieron las concentraciones de interleucinas producidas por los linfocitos de bazo de ratón sensibilizados con células completas de *A. seminis* en cultivo celular.



Grafica 2. Inducción de IL-2, IL-4 e INF- γ en células de ratón Balb/c estimuladas con células completas de *A. seminis*



6.2 Hipersensibilidad tardía (Prueba de DTH).

Otra prueba realizada para evaluar la respuesta inmune inducida por las células completas de *A. seminis* fue la reacción de DTH en el cojinete plantar de ratón previamente inmunizado con células completas de *A. seminis*.

El comportamiento de los datos de grupo testigo se mantuvo igual al inicio de la prueba, a las 24 y 48 horas respectivamente. Al comparar los valores obtenidos entre el cojinete testigo y la induración a las 24 horas, la prueba de t-student nos indica que existe una diferencia significativa entre ambos valores ya que tenemos un valor de $p < 0.05$ ($P = 0.0023$), lo cual sugiere que existe un aumento de induración considerable (TABLA 7) lo cual podemos observar en la grafica 3 donde claramente se aprecia la diferencia entre ambos grupos siendo mayor el valor a las 24 horas posteriores a la prueba. Se compararon estadísticamente los datos del grupo testigo y los datos a las 48 horas, el análisis con una $p < 0.05$ ($P = 0.0001$), indica que hay una diferencia significativa entre ambos grupos, este valor de induración es el mas importante en la prueba DTH (TABLA 7), en la grafica 3, el valor a las 48 horas muy parecido al obtenido a las 24 horas, estadísticamente al realizar la comparación de ellos se obtuvo un valor de $p > 0.05$ ($p = 0.7908$), lo cual indica que no existe diferencia significativa entre estos datos, por lo tanto a las 24 y 48 horas el valor de induración no se incrementa, ni disminuye (TABLA 7 Y GRAFICA 3),.

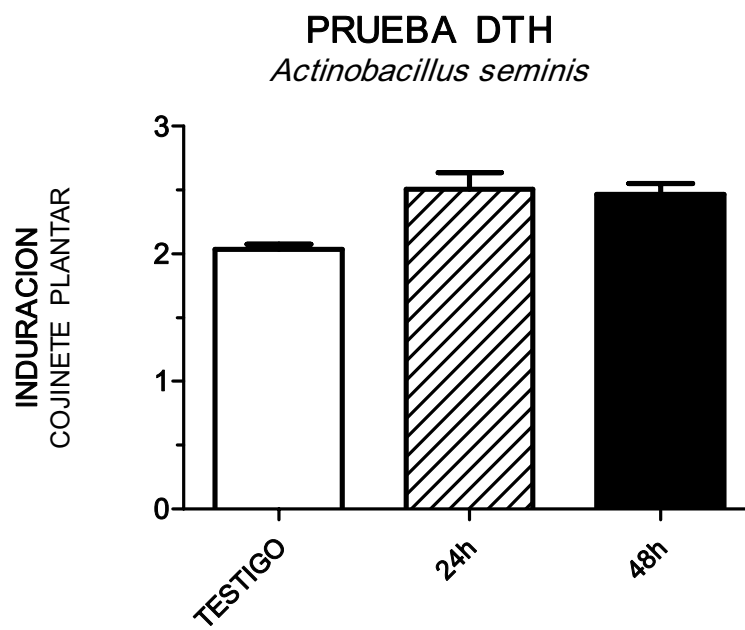
6.3 Análisis estadísticos para Prueba de DTH.

Tabla 8 Análisis estadístico t-student (bilateral) de la prueba DTH

	TESTIGO	24 HORAS		TESTIGO	48 HORAS		24 HORAS	48 HORAS
	2.033	2.508		2.033	2.467		29.65	25.207
S	0.150	0.452	S	0.150	0.290	S	30.78	3.19
n	10	10	n	10	10	n	10	10
	<p>p=0.0023 t=3.4544 $\alpha=0.05$ (95%)</p>			<p>p=0.0001 t=4.5962 $\alpha=0.05$ (95%)</p>			<p>p=0.7908 t=0.2686 $\alpha=0.05$ (95%)</p>	

Grafica 3. Prueba DTH.

Se puede observar claramente que si existe un aumento de induración muy significativo a las 24 y 48 horas, al compararlo con los valores testigo.



7. Discusión.

A. seminis y *Brucella ovis* están considerados como los principales agentes infecciosos causantes de la epididimitis es por ello la gran importancia de encontrar alternativas de diagnóstico diferencial entre los géneros microbianos involucrados en cuadros de epididimitis así como una oportuna y adecuada detección del agente infeccioso. Al determinar las concentraciones de interleucinas producidas por los linfocitos de bazo de ratón resultados de la tabla 5 se aprecia la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ nos indican una activación de células CD4⁺ (FIGURA 4), estudios recientes en los que han inducido epididimitis "in vivo", establecen que *A. seminis* provoca una respuesta inmune local caracterizada por la aumentada presencia de linfocitos CD4, CD8, TCR, macrófagos, células CD45RO. (Tortora y col., 2007). Existen numerosos estudios de antígenos de *Brucella ovis* que demuestran la capacidad de activar una respuesta inmune, los cuales han sido empleados para encontrar un adecuado inmunógeno o desarrollar una prueba diagnóstica diferencial (Zhan y col., 1993^a; Salas, 2004; Núñez del Arco y col., 2006). En el caso de *Brucella ovis* han sido purificadas y caracterizadas Omp's con la finalidad de estimular una respuesta celular (Baldwin y col., 1985). Actualmente se ha medido la inducción de diversas interleucinas, como son IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 por *B. ovis* (Baldwin y col., 1985), lo cual ha permitido plantear los mecanismos que sigue esta bacteria, teniendo como resultado una buena documentación de su epidemiología y patogénesis (Biberstein, 1964; Brown y col., 1973; Walker, 1986).

Dentro del mismo género en el que se encuentra *A. seminis* se encuentran especies de gran importancia a nivel veterinario como humano que son importantes mencionar ya que en algunos de ellos se han realizado estudios para evaluar sus mecanismos de patogenicidad por ejemplo en *Actinobacillus actynomicetemcomitans* se ha demostrado experimentalmente la inducción de apoptosis en macrófagos y Linfocitos T (Miyuki, 1997; Nalbat, 2002), también se ha demostrado que inhibe la producción de IL-6 e IL-8 en cultivo de fibroblastos (Ohguchi, 2003), por otra parte se ha comprobado el mecanismo que permite la adhesión a la placa bacteriana (Miyuki, 1997), actualmente se ha reconocido que la célula completa es capaz de estimular la producción de IL-4, IL-5 e IL-6 en cultivo de macrófagos en el modelo murino (Tetsuo, 2004).

En este trabajo se evaluó la inducción de Interleucinas a partir de una previa inmunización con células completas de *A. seminis*, pudimos comprobar la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ , que es capaz de activar la célula completa de *A. seminis*. Debido a la gran cantidad de determinantes antigénicos presentes no se puede plantear en forma específica cual componente es capaz de desencadenar la respuesta específicamente, por ello es importante purificar y caracterizar componentes específicos de *A. seminis* como se realizó en recientes estudios en donde se identificó una proteína de membrana externa de 75 KD la cual resulta específica de *A. seminis* y puede ser empleada potencialmente en el diagnóstico y la profilaxis (Núñez y col., 2006), reconociéndose su presencia en vesículas de membrana externa, las cuales son liberadas al medio por la misma bacteria.

La inducción de producción de IL-2, IL-4 e - IFN- γ , por los linfocitos de bazo de ratón sensibilizadas con células completas de *A. seminis*, muestra que esta bacteria despierta una respuesta inmune humoral debida a la presencia constante de IL-4, por otra parte y aunque no parece determinante se observa que también existe una respuesta celular, la cual se caracteriza por una inducción temprana (24 horas) de IL-2 y una posterior (120 horas) de IFN- γ . Lo cual sugiere una respuesta inmune combinada Th1/Th2, el análisis estadístico bilateral t-student con un grado de significancia del 95%, al comparar IL-2 e IL-4 el valor para $p > 0.05$ ($p = 0.4215$) no existe diferencia significativa entre ambos grupos, así que hay activación de ambas respuestas tanto humoral como celular, al realizar la comparación entre IL-2 e IFN- γ , obtenemos un valor de $p > 0.05$ ($p = 0.4553$), en donde tampoco hay diferencia significativa, ello sugiere que existe inducción de la respuesta celular ya que estas dos interleucinas son representativas de esta respuesta al ser producidas por linfocitos (Th1)CD4+; con un valor de $p > 0.05$ ($p = 0.9515$) para el análisis estadístico de los valores de IFN- γ e IL-4, nos indica que ambas respuestas son iguales al no haber diferencia significativa, por lo tanto hay una inducción combinada; la grafica 5 nos indica que prevalece al final de la prueba la respuesta humoral ya que los valores de IFN- γ se mantienen por arriba de los valores de IL-4 que es una interleucina representativa de la respuesta humoral pero el análisis estadísticos permite elucidar entre ambos y así se sugiere activación mutua de ambas respuestas. Se ha demostrado en estudios en *B. ovis*, en donde se han empleado cultivos de células de bazo de ratón inoculados con bacterias completas muertas o extractos de bacterias, existió una inducción de la producción exclusivamente de IL-2 (no de IL-4 o IFN- γ), en contraste cuando se emplearon bacterias vivas, las cuales produjeron IL-2 e IFN- γ pero no IL-4 (Zhan y col., 1995).

En otros estudios donde se midió la producción de interleucinas inducidas resultados similares están reportados acerca de la inducción de interleucinas de *B. ovis*, en dicho estudio el antígeno HS fue encapsulado dentro de macropartículas de poli-ε-caprolactona (HS-PEC) indujo altas cantidades de IL-2 y bajas de IL-4, lo que sugiere una respuesta combinada (Murillo y col., 2001). En otros trabajos de *B. ovis* se ha evaluado el comportamiento de la producción de IL-2, IL-4 e IFN-γ utilizando fracciones subcelulares de *B. ovis* membrana externa (Omp), membrana interna (Imp) y citosol, en donde la fracción de Omp induce una rápida y fuerte respuesta de IL-2 a las 24 horas, disminuyendo a las 48, obteniendo IFN-γ una fuerte respuesta después de las 72 horas, una fuerte inducción de IL-4 a las 72 horas, la fracción Imp muestra una adecuada respuesta de IFN-γ a las 24 horas, iniciando la de IL-2 a las 24 horas, mientras que IL-4 no produce respuesta; la fracción de citosol de IFN-γ mantiene una adecuada respuesta, IL-2 muy débil e IL-4 no induce. (Salas y col., 2004). Cuando los linfocitos CD4+ se hallan activados por un antígeno, (células completas de *A. seminis*) tienden a diferenciarse en dos subtipos funcionales, denominados Th1 y Th2, caracterizados por su capacidad para producir un diferente espectro de interleucinas en respuesta al estímulo antigénico. Los linfocitos Th1 secretan sobre todo IL-2 e IFN-γ las cuales favorecen el desarrollo de linfocitos CD8+ citotóxicos y promover las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), (Inmunidad celular), por otra parte los linfocitos Th2 encargados de liberar interleucinas entre las que destaca IL-4, que estimula la producción de anticuerpos (Inmunidad humoral) (Paradowska y col., 2004). (FIGURA 4)

Los resultados obtenidos en la respuesta de la DTH (Intradermorreacción), esta prueba que busca conocer la inmunidad celular a una sustancia o microorganismo. Lo que observamos al realizar el análisis estadístico t-student bilateral, un valor de $p < 0.05$ ($p = 0.0023$) al comparar los datos testigo y la induración a las 24 horas, indica que si hay una diferencia significativa por lo cual si hay respuesta inflamatoria; al analizar los valores de testigo y 48 horas una $p < 0.05$ (0.0001) sugiere que hay diferencia significativa, el valor mas importante es a las 48 horas ya que la inflamación o induración pudo deberse a la acción del piquete en el cojinete plantar por ello se sugiere que si hay una valor de induración importante ya que si es por inducción de las células completas *de A. seminis* ya que un valor de $p > 0.05$ ($p = 0.7908$) indica que no hay diferencia significativa entre las 24 y 48 horas. *Esto* contrasta con la inducción encontrada en IL-2 e IFN- γ donde el comportamiento es presuntivamente una activación de respuesta inmune celular, lo que refuerza los datos obtenidos en la medición de interleucinas en el cultivo celular en donde nos indica la inducción de la respuesta celular.

VIII. Conclusiones

1. La cepa de *A. seminis* ATCC 15768 fue caracterizada con las pruebas bioquímicas secundarias, principalmente con la tinción de Stamp, donde se aprecian bacilos de color azul.
2. Se trabajaron 2 grupos de ratones el primer grupo de 15 y el otro de 10 ratones de la cepa Balb/c los cuales fueron inmunizados con células completas de *A. seminis* por cuatro semanas previas al sacrificio.
3. El grupo de 15 ratones se utilizó para el cultivo de linfocitos de bazo de ratón, el segundo grupo para la prueba de DTH.
4. La cuantificación de la producción de interleucinas por parte de los linfocitos de bazo de ratón sensibilizados con células completas de *A. seminis* es una respuesta inmune combinada Th1 como Th2 (Celular y humoral), lo cual abre una nueva línea de investigación en donde se pueda purificar y caracterizar componentes de *A. seminis*, evaluar en forma específica la inducción de cada una de las respuestas.
5. La prueba DTH indica que la induración observada en el cojinete plantar de ratón sensibilizado con células completas de *A. seminis* fue debido a la presencia de las mismas ya que hay una diferencia estadística significativa entre los valores de testigo, a las 24 y 48 horas respectivamente, hay una inducción de la respuesta celular, ello refuerza el valor obtenido al medir IL-2 e IFN- γ en el cultivo celular.
6. Se requieren estudios posteriores que permitan evaluar otras interleucinas como IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 que permitan un panorama más específico y así comprobar cuál es la respuesta que se activa primero si la humoral o la celular, y así encontrar métodos terapéuticos y de profilaxis para el manejo de animales infectados con epididimitis.

IX. Referencias

- Acosta D. J., Buendía A., Tenorio G, V., Tortora P. Distribución de Linfocitos CD4, CD8, TRC , células CD45RO, macrófagos (CD14) y células dendríticas (CD1B) en las glándulas anexas al aparato reproductor de carneros inoculados con *Actinobacillus seminis*. Proyecto PAPITT-UNAMIN206101, Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina (2007).
- Acosta J. Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos. **Tesis de Maestría en Microbiología**. FESC, UNAM (2001).
- Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet** 1997; 349 (9050):490-495.
- Appuhamy, J. G. Coote. PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strains. **Journal of Clinical Microbiology**.1998; 36(3):814-817.
- Arteaga. **La ovicultura en México**.1999.
- Bagley C. V. Epididymitis in range and purebred rams. **J Am Vet Med Ass** 1997; 18(14):198-191.
- Baldwin C. L., Verstrate D.R., Winter A. J. Immune response of cattle to *Brucella abortus* outer membrane proteins measured by lymphocyte blastogenesis. **Vet Immunol Immunopathol**. 1985; 9(4):393-396.
- Barrett JR. Chemokines. **Blood**.1997; 90(3):909-1008.
- Baynes, I. D. And Simmons, G. C. Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* .N. sp. **Australian Veterinary Journal**.1960; 36:454-459.

-
- Belonje X. W. A. Psdotuberculosis of sheep. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**.1972; 22(4):165-173.
 - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **The Williams & Wilkins Co, Baltimore**. 1984; 1:254-256.
 - Biberstein, E.L.; McGowan, B.; Olander, H.; Kennedy, P.C. Epididymitis in rams studies on pathogenesis. **Cornell Veterinarian**.1964; 54(4):27-41.
 - Bohinski, R. Bioquímica. Estados Unidos. **Fondo Educativo Interamericano**. 1978:146.
 - Brown, G.M.; Pietz, D.E.; Price, D.A. Studies on the transmission of *B. ovis* infection of rams. **Cornell Veterinarian**.1973; 63(12):29-40.
 - Brumpt E. Précis de Parasitologie. **Masson ET Cie, Paris**, 1910; um.
 - Buddle M.B. Studies on *Brucella ovis* n. sp., a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Journal of Hygiene**.1956; 54(3): 351-64.
 - Burgess HW. Ovine contagious epididymitis: a review. **Vet Microbiol**. 1982; 7(6):551-575.
 - Cardenas, A. L. and Maki, L. R. Detection of antibody in rams with contagious epididymitis, using the enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**.1986; 47(4): 738-739.
 - Chatelain R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J Immunol**.1992; 148(4): 1182-1187.
 - Cornick, N. A., Booher, S. L., Casey, T. A., Moon, H. W. Persistent Colonization of Sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and Other *E. coli* Pathotypes. **Appl. Environ. Microbiol**. 2000; 66(11): 4926-4934.

-
- De la Puente- Redondo V. A., Garcia B.N., Perez M. C., González R. M. C., Rodriguez F. E. F., Gutierrez M.C.B. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. **J Comp Pathol.** 2000; 122(2-3):217-222.
 - De Long W.J., Waldhalm D.G. & Hall R.F. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. **Am. J. Vet. Res.** 1979; 40(1):101–102.
 - E. Salas-Téllez, A. Núñez del Arco, V. Tenorio, E. Díaz-Aparicio, M. de la Garza, F. Suárez-Güemes. Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon- in mice. **The Canadian Journal of Veterinary Research.** 2005;69(1):53–57
 - Egerton, J. R. Foot-rot and other foot conditions. *In* Diseases of sheep, 3rd Edition. **W. B. Martin and I. D. Aitken. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.** 2000 (8):243–249.
 - Ekdahl MO, Money DFL, Martin CA. Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. **N.Z. Vet J.** 1968; 16(5):81-82.
 - Fodor, L., Varga, J., Hajtos, I., Szemerédi G. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep, goats and calves. **Zbl. Vetmed. B,** 1984; 31: 466-469.
 - Genetzky R.M. Epididymitis in Rams. **The Compendium Food Animal.** 1995; 17(3):447-454.
 - Hafez ESE. Reproduction in farms animals. 6ed. Ed. **Lea & Febiger.** USA. 1993; 45(12): 402-404.
 - Healey M.C., Hwang H.H., Morgan, Aitken Y. Y. A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. **Can J Vet Res.** 1991; 55(2):121-127.

-
- Heath PJ, Davies JH, Morgan, Aitken IA. Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. **Vet Rech** 1991; 129(14):304-307.
 - Hidalgo R. María Elena, Obtención de un suero hiperinmune contra una proteína de 75 kDa a partir de una cepa de referencia de *Actinobacillus seminis*, **Tesis de Licenciatura**. FESC, UNAM (2003).
 - Jansen B. C. The epidemiology of bacterial infection of the genitalia in rams. **Onderstepoort J Vet Res**. 1983; 50(4):275-282.
 - Jansen, B.C. A surgical technique for the experimental reproduction of epididymitis in rams. **Onderstepoort J Vet Res**. 1980; 47(4):281-283.
 - Jansen, B.C. The etiology of ram epididymitis. **Onderst. Journal Vet. Res**. 1982; 47(2):101-107.
 - Jansen, B.C. The pathology of bacterial infection of the genitalia in rams. **Onderstepoort J Vet Res**. 1980; 47(4):263-267.
 - Koneman E W, Allen S D, Janda W M. *Haemophilus*. Koneman, Diagnostic Microbiology, fourth edition, **Philadelphia, J P Lippincott Company**, 1992: 279-301.
 - Korostoff J. Wang J. F., Kieba I. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Leukotoxins induces apoptosis in HL-60 cells. **Infect Immun**. 1998; 66(9):44474-4483.
 - Livingston CW, Hardy WT. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. **Ame J Vet Res**. 1964; 25(6):660-663.
 - Low J. C., Somerville D., Mylne J. A., Mckelvey W. A. C. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. **Vet Rec**. 1995; 136(11):268-269.

-
- Lozano E. A. Etiologic significance of bacterial isolates from rams with palpable epididymitis. **American Journal Veterinary Research**.1986; 47(5):1153-1156.
 - Maggi E, Parronchi P, Manetti R. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **J Immunol**.1992; 148(7):142-147.
 - Mbai K., Munyua SJM, Gathumbi PK, Mbiuki SM. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. **Small Rum Res**.1996; 21: 227-231.
 - Méndez N. G., Díaz A. E., Aguilar R. F., Morales A. J., Sus O. Presencia de *Actinobacillus seminis* en borregos de la región central de México. **Reunión Nacional de Investigación pecuaria Morelos** 1996.
 - Miller RB, Barnum DA, McEntee KE. Hemophilus somnus in the reproductive tracts of slaughtered cows: location and frequency of isolations and lesions. **Vet Pathol**. 1983; 20(5):515–521.
 - Miyuki M. Takeyoshi K. Role of CD14 Molecules in Internalization of *Actinobacillus actynomycetemcomitans* by Macrophages and Subsequent Induction of Apoptosis. **Infection Immunity**. 1997; 65(4):1147-1151.
 - Molina Sánchez D. Respuesta al pastoreo de ovinos de una pastura de *Agropyron cristatum* (Scherb.) implantada en la estepa semiárida de la Patagonia. Austral Comunicación. **Rev. Arg. Prod. Anim**.1985; 5(11-12): 699-706.
 - Munoz C, Carlet J, Fitting C. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **J Clin Invest** .1991; 88(5): 745-747.
 - Murillo M., Grillo M.J., Reñe J., Marin C. M., Barberan M., Goñi M. M. A *Brucella ovis* bearing poli-ε-caprolactona microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. **Vaccine**. 2001; 19(30): 4099-4106.

-
- Nalbant A., Zadeth H. *Actinobacillus actynomicetemcomitans* induces apoptosis of T lymphocytes by the Fas and Fas Ligand pathway. **Oral Microbiology Immunology**. 2002; 17(4):277-284.
 - Neat PH, Stevens M. *Actinobacillus rossii* sp. Nov., *Actinobacillus seminis* sp. Nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. Nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov, *Pasteurella mairi* sp. Nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. Nov. **Int J SystBacteriol**.1990;40(2):148-153
 - Nicolet, J. Compendio de bacteriología Médica Veterinaria, **España; Acribia**. 1985: 59.
 - Núñez-del Arco A, Salas-Téllez E, de la Garza M, Díaz-Aparicio E, Tenorio-Gutiérrez V. Identification of an immunogenic protein of *Actinobacillus seminis* that is present in microvesicles. **Can J Vet Res**. 2006; 70(1):43-49.
 - Ohguchi Y., Ishihara Y. Capsular polysaccharide from *Actinobacillus actynomicetemcomitans* inhibits IL-6 and IL-8 production in human fibroblast **Periodontal Res**. 2003; 38(6):190-197.
 - Oviedo F.C., Hernández V. C., Hernández G. S., Reyes G. A. Epididimitis ovina (*Brucella ovis*). Diagnostico, Prevalencia y descripción en el Estado de México. **Memorias del 1er Congreso Nacional de la Producción ovina**. La Calera, Zacatecas. México 1988.
 - Palomares Resendiz Gabriela E. Evaluación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de *Actinobacillus seminis* en ovinos. **Tesis de maestría en Ciencias de la Reproducción y Salud Animal**. FMVZ, UNAM (2003)

-
- Paradowska A, Bohring C, Krause W. Identification of mouse sperm membrane antigens by human antisperm antibodies as murine model of immunological infertility. *Androl* 2004; 363:129-132.
 - Pohl, S. DNA relatedness among members of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*. In: *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, M, Kilian, W. Frederiksen, and E. L. Biberstein. **Academic Press, London**. 1981:245-253.
 - Reyes Aguayo Maricruz. Determinación de vesículas de *Actinobacillus seminis* y *Brucella ovis* mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión. **Tesis de Licenciatura**. FESC, UNAM .2002.
 - Robles CA. Epididimitis contagiosa de los cameros por *Brucella ovis*. **Revista de Medicina Veterinaria**. 1998; 79 (1): 67-71.
 - Robles, C.A., Urcullu, J.A., Uzal, F.A., Merlo, R. Primer diagnóstico en Patagonia de orquioepididimitis en cameros por bacilos pleomórficos gram negativos. **Vet.Arg.** 1990:7(67): 453-455.
 - *Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC*, Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. **Ann Surg**. 1989; 210(4): 474.
 - Salas T., E., Núñez A., Tenorio G., Díaz A., de la Garza A., Y Suárez G. Producción de IL-2 e IFN- γ en respuesta a tres fracciones subcelulares de *Brucella ovis*. FES-Cuautitlán, UNAM, CENID-Microbiología, INIFAP, CINVESTAV, IPN, d FMVZ, UNAM. XXXVI REUNION NACIONAL DE INVESTIGACION PECUARIA. Sonora 2000.
 - Salas Téllez Enrique. Estudio de la respuesta inmune celular de fracciones subcelulares de *Brucella ovis*. **Tesis de Doctorado en Ciencias de la Reproducción y Salud Animal**. FESC, UNAM (2004).

-
- Simmons, G.C.; Baynes, B.V.; Ludford, B. Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in a folk of Border Leicester sheep. *Australian veterinary Journal*. 1966; 42:183-187.
 - Sneath P. H. A. and Stevens M. *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. Nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. **International Journal of systematic bacteriology**.1990; 40(2):148-153.
 - Sponenberg D. P., Carter M. E., Carter G.R., Cordes D.O., Stevens S.E., Veit H. P. Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. **J Am Vet Med Ass** .1983; 182(9):990-991.
 - Stephens LR, Humphrey JD, Little PB, Barnum DA. Morphological, biochemical, antigenic, and cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis*.**J Clin Microbiol**. 1983; 17(5):728-37.
 - Swift, B.L., Craddock, F., Hancock, H.A., Jensen, R., Thomas, G.M.Trueblood, M.S.Ram epydidimitis, a clinical report.**Theriog**. 1982; 17 (3):343-47.
 - Tatsuo K. *Actinobacillus actynomicetemcomitans* possesses an antigen binding to anti-human IL-10 antibody. **FEMS Microbiology Letters**. 2001; 204 (12):293-297.
 - Trevisan V. Sul Micrococco della rabbia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona moricata, se ha contratta l'infezione rabbica. **Rendiconti dell'Istituto Lombardo di Scienze e Lettere**. 1887; 20(4):88-105.
 - V. A. de la Puente Redondo, N. García del Blanco. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital Tract of Rams in Spain. **J. Comp. Path**. 2000; 122(2-3):217-222.

-
- Van Tonder EM. Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. **J S Afr Vet Ass** 1973; 44(3):235-240.
 - Van Tonder, E.M. Actinobacillus seminis infection in sheep in the Republic of South Africa I. Identification of the problem. **Onderstepoort Journal of veterinary Research**.1979 46(3):129-133.
 - Walker R. L., Leamater B.R. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the tract of sheep. **Am J Vet Res**.1986; 47(9): 1928-1930.
 - Walker R.L., Leamaster B.R., Stellflug J. N., Biberstein E. L. Association on age of rams with distribution of epididymal lesions an etiologic agent. **J Am Vet Med Ass**. 1986; 188(4):393-396.
 - Walker, R.L., Leamaster, B.R. Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep.**Am.J.Vet.Res**.1986; 47(9): 1928-1930.
 - Watt, D. A. Investigation of ovine brucellosis in Merino Rams of Western Australian. **Australian Veterinary Journal**. 1970;46(10):506-508
 - Watt, D. A. Some aspects of reproductive wastage in rams. **Australian Veterinary Journal**.1966; 42(6): 437-439.
 - Winslow C.E.A., Broadhurs J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A. and Smith G.H. The families and the genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. **Journal of Bacteriology**.1917; 2(5):505-566.
 - Zhan Y. F., Kelso A., Cheers. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4 T-cell infection or immunization with antigenic extracts. **Infect Immun**. 1995; 63(11): 969.
 - Zhan Y. F., Kelso A., y Cheers C. Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. **Immunology**.1993b; 80(6):458.