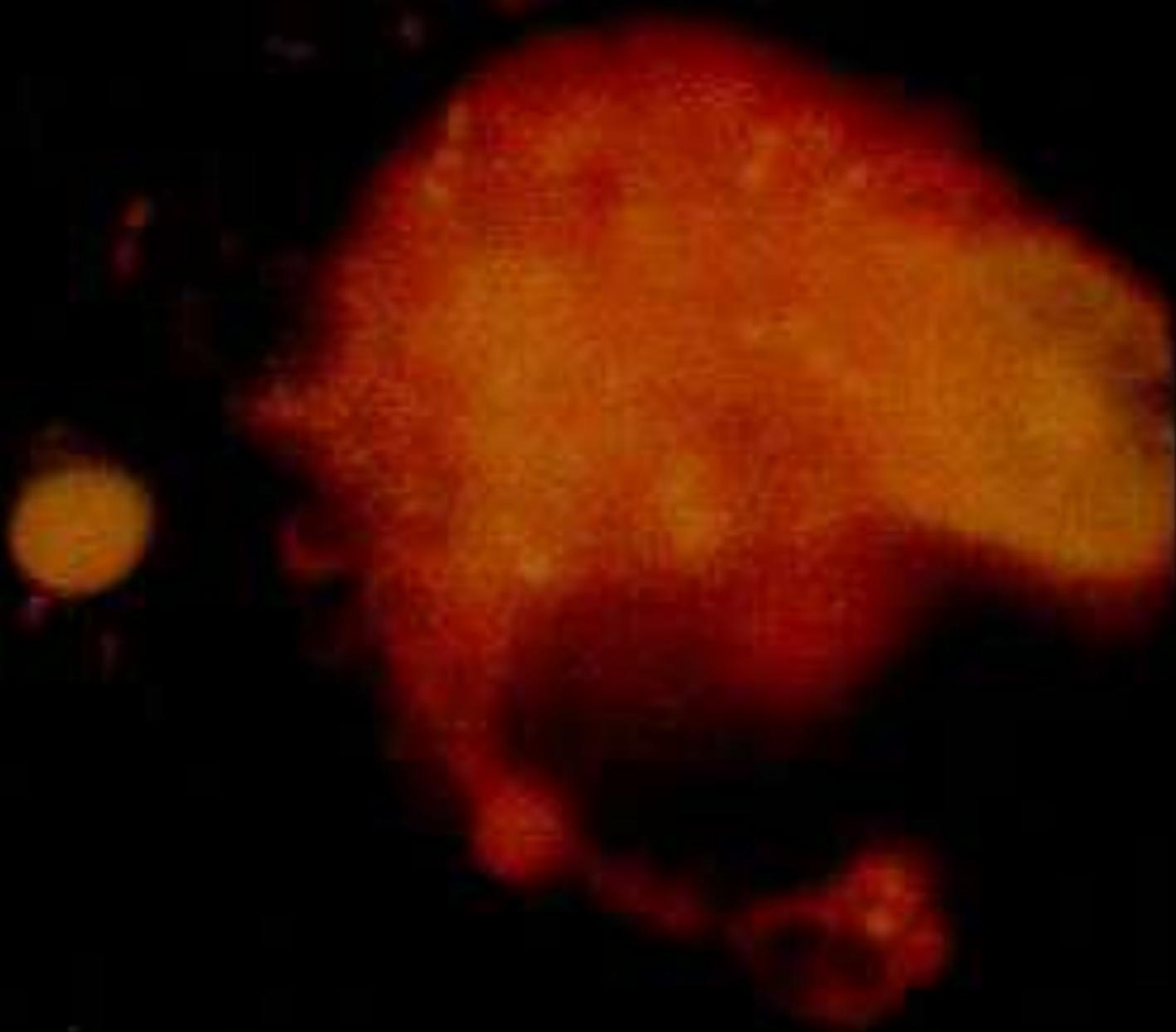


**BASES DE
INMUNOLOGIA AVIAR**



Jorge Ossa Londoño

**BASES DE
INMUNOLOGIA
AVIAR**

Jorge Ossa Londoño

BASES DE
IMUNOLOGIA
AVIAR

Jorge Ossa Londono

BASES DE INMUNOLOGIA AVIAR

Derechos Reservados

Luzerna Año 1982

Publicaciones Periódicas Colombianas

Medellín - Colombia

© 1980

Impreso y hecho en Colombia

Printed and made in Colombia

ISBN 958-825-80-7

Jorge E. Ossa L, MV,Ph.D.

**Profesor Titular, Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Apartado. aéreo
1226, Medellín**

Centro Microbiológico de un municipio de gran importancia
Medellín (ver capítulo 7)

BASES DE INMUNOLOGÍA AVIAR

Derechos Reservados
Apartado Aéreo 4932
Publicaciones Politécnico Colombiano
Medellín - Colombia
© 1990
Impreso y hecho en Colombia
Printed and made in Colombia

ISBN 958-9262-00-7

Profesor Titular, Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Apartado aéreo
1200 Medellín

**Carátula: Microfotografía de un macrófago de pavo fagocitando
Moraxella bovis. (ver capítulo 7).**

Dedicatoria:

A mis colegas médicos veterinarios y zootecnistas, con motivo de los 30 años del Colegio de Médicos Veterinarios y de Zootecnistas de Antioquia (COLVEZA).

Agradecimientos:

A mis maestros Nacho Correa, Tom Yuill y Gerhardt Schurig.

A la Academia de Patología Aviar de Antioquia (ACAPA) y a la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura (AMEVEA), encargados de promover y velar por el desarrollo de la medicina aviar en Colombia, cuyas invitaciones a participar en sus simposios internacionales fueron el estímulo definitivo para la materialización de esta pequeña obra.

Al Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid", por su interés en la publicación del trabajo y al personal de Publicaciones cuya pericia y entusiasmo hicieron de la última fase del proyecto una agradable y enriquecedora experiencia.

PRESENTACION

La Patología Aviar ha logrado constituirse en una de las disciplinas más destacadas de la Medicina Veterinaria, en los últimos años, como consecuencia del desarrollo acelerado de la industria avícola y de los avances científicos y tecnológicos, producto de la investigación científica.

En Colombia, durante las dos últimas décadas, la industria avícola se ha destacado por su crecimiento y su consecuente impacto socioeconómico. No obstante, creemos que la investigación básica y aplicada en Patología Aviar no marchan al mismo ritmo de progreso. Particularmente nos preocupa la falta de programas académicos a nivel de pregrado y posgrado, que propendan por la construcción de una **Escuela Nacional de Patólogos Aviaries**, como corresponde a la importancia real de la industria avícola del país.

El aporte del Doctor Jorge E. Ossa Londoño, apunta hacia esa meta de desarrollo, acorde con los más recientes descubrimientos científicos y con el futuro de la Medicina Veterinaria Colombiana, cuales han sido sus más vehementes preocupaciones profesionales.

La Inmunología es el centro del pensamiento médico de hoy, como lo fue ayer la Patología y lo será mañana la Biología Molecular. Ningún otro tema podría ser, entonces, más indicado para contribuir al esfuerzo de los pioneros de la Patología Aviar de Colombia, por la construcción de una base científica para asegurar el desarrollo de esta disciplina.

El texto está dirigido, primordialmente, a estudiantes y profesionales de la Medicina Veterinaria; pero, por su enfoque filogenético y comparativo, también Biólogos y Microbiólogos podrían encontrarlo de utilidad. Por todo lo anterior, el Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid", se complace en presentar **BASES DE INMUNOLOGIA AVIAR**, como una obra única en su género, en nuestro medio y de gran trascendencia para el desarrollo del sector pecuario.

LUZ MARINA HENAO HIDRON

Rectora

FABIO NELSON ZULUAGA TOBON

Vicerrector Académico

CONTENIDO

Presentación

Prefacio	13
1. Introducción	15
2. Ontogenia y función de la bursa de Fabricio	19
3. Ontogenia y función del timo	31
4. Fase inductora de la respuesta inmune	39
4.1 Antígenos	39
4.2 Organos linfoides periféricos	41
4.3 El complejo mayor de histocompatibilidad	45
4.4 Fisiología de la respuesta inmune	46
4.5 El sistema inmune secretorio	49
5. Fase efectora de la respuesta inmune	55
5.1 ¿Qué son y para qué sirven los anticuerpos?	55
5.2 ¿Qué es y para qué sirve el complemento?	59
5.3 ¿Qué son y para qué sirven las citoquinas?	62
5.4 Cuáles son y para qué sirven las células citotóxicas?	64
5.5 Resumen: La inducción y la acción de la respuesta inmune?	66
6. La Eimeria tenella: Un modelo de investigación inmunológica	71
7. Cultivo y caracterización de monocitos/macrófagos de pavo	79
8. Epílogo: Las aves como modelo de investigación básica de inmunopatología con aplicación al hombre.	101
9. Bibliografía consultada.	107

CONTENIDO

102	Bibliografía consultada
101	Inmunopatología con aplicación al hombre
100	El Balamo: Las aves como modelo de investigación básica de
99	Y. Ochoa y caracterización de nuevos parásitos de aves
97	6. La técnica celular: Un modelo de investigación inmunológica
88	5.2. Balamo: La infección y la acción de la respuesta inmune
84	5.1. Oculas son y para qué sirven las células eucariotas?
82	5.3. Oculas son y para qué sirven las células?
80	5.2. Oculas es y para qué sirve el complemento?
78	5.1. Oculas son y para qué sirven los antígenos?
68	5. Fases elementales de la respuesta inmune
48	4.5. El sistema inmune asociado
46	4.4. Fisiología de la respuesta inmune
44	4.3. El complejo mayor de histocompatibilidad
42	4.2. Organización linfática de mamíferos
39	4.1. Antígenos
36	4. Fases inductoras de la respuesta inmune
31	3. Ontogenia y acción del timo
19	2. Ontogenia y función de la bursa de Fabricio
18	1. Introducción
13	Prefacio
12	Presentación

PREFACIO

Bases de Inmunología Aviar es el producto de inquietudes y estímulos cultivados a través de varios años de ejercicio investigativo y docente. Se trata, no solamente, de producir una versión colombiana del tema, objetivo de por sí justificable, sino también de cumplir un compromiso académico con mi profesión y con la Inmunología.

El texto está dirigido para el estudiante y el profesional de la medicina veterinaria, quienes encontrarán información para satisfacer algunas de sus inquietudes y observaciones clínicas. Igualmente es recomendable para el biólogo, el veterinario y el microbiólogo con intención de incursionar en el área de la Inmunología: en el texto se encuentran enunciados algunos de los enigmas fundamentales que podrán servir de introducción, antes de proseguir al terreno más complejo de la Inmunología de los mamíferos.

Lo anterior merece una explicación: realmente no creo que la Inmunología Aviar sea menos compleja en su estructura fundamental; pero en la actualidad, tenemos más información sobre mamíferos que sobre aves; por lo tanto cuando hablo de complejidad no me refiero al sistema mismo, sino al estado actual de la información.

Permítaseme finalmente tratar de dar respuesta a la pregunta que, seguramente, ya se ha formulado el lector: es tan grande la diferencia entre aves y mamíferos para justificar un tratamiento separado del tema?.

La respuesta es doble. Para el médico veterinario, en su práctica rutinaria de vacunaciones, tratamientos y manejo en general, al momento de formular sus recomendaciones, los principios inmunológicos que ha de tener en cuenta, son básicamente los mismos para aves y para otras especies. Sin embargo, desde el punto de vista básico, sí tenemos que reconocer que existen varias y muy fundamentales diferencias como se desprende de la información presentada en el texto.

El sistema inmunológico, a través de la escala zoológica ha evolucionado en forma sostenida; es decir, sin grandes rupturas como sí ocurrió con el metabolismo (de ectodermos a endodermos), o con la reproducción (de ovíparos a vivíparos). Por ello, la división entre vertebrados mayores y menores, además de ser ambigua, carece de sentido cuando se trata del sistema inmunológico.

Finalmente debo anunciar que **Bases de Inmunología Aviar**, no es un trabajo terminado, sino un proyecto permanente de servicio a la medicina veterinaria colombiana, para lo cual espero contar con los comentarios y sugerencias de todos los lectores.

1. INTRODUCCION

Desde el punto de vista de la inmunología propiamente dicha, las aves han jugado un papel protagónico en la consolidación de esta ciencia, sirviendo de modelo animal para definir la dicotomía entre la inmunidad humoral y la inmunidad celular, enunciada teóricamente desde el siglo anterior, y para determinar el carácter de inmigrantes de los linfocitos de la bursa y del timo.

Aparte del anterior argumento que podría parecer puramente académico, las aves representan la segunda especie más importante en la producción de proteína para consumo humano, después de los bovinos y seguidas de muy cerca por los porcinos; además, algo más importante, es el hecho que las aves son, después de los bovinos de leche, la especie más eficiente para la conversión de proteína y energía. Todo esto puede dar una idea del impacto económico y social de estas especies y de la avicultura como especialidad de las ciencias pecuarias.

Cómo podríamos definir el papel de la inmunología en la avicultura moderna?

Pues bien, aún para el iniciado en el estudio de ecología de las enfermedades infecciosas, es claro que la gran densidad de población que implica la avicultura rentable, y el estrés a que se someten las aves, entre otras cosas por el consumo de grandes cantidades de alimento para obtener el máximo crecimiento en el menor período de tiempo, hacen del galpón un excelente caldo de cultivo para bacterias, virus, hongos y otros parásitos. La avicultura

moderna sólo es posible gracias a la inmunología que ha permitido el desarrollo de vacunas para la gran mayoría de enfermedades infecciosas.

Para empezar a entender la inmunología aviar, es importante pensar en la posición filogenética de las especies aviares con relación a los mamíferos. Las aves aparecieron en la era del mesozoico, después de los reptiles y antes de los primeros mamíferos, los marsupiales. Aves y mamíferos tenemos en los reptiles un ancestro común y por lo tanto se espera que el sistema inmunológico, que es también el producto de la evolución, tenga mecanismos básicos comunes. Podríamos precisar más el concepto anterior diciendo que las aves siendo especies más evolucionadas que los reptiles, pero menos evolucionadas que los mamíferos, deben tener un sistema inmunológico más complejo que los primeros, pero menos complejo que el de los segundos. Efectivamente es así; las diferencias principales se señalan en la tabla 1.

Tabla 1. Principales diferencias entre el sistema inmune de las aves y los mamíferos.

Presencia de bursa.

- Timo lobulado (como también ocurre en bovinos).
 - Ausencia de ganglios linfáticos.
 - Glóbulos rojos y trombocitos (plaquetas) nucleados.
 - Glándula Harderiana linfoide.
 - Glándula pineal linfoide.
 - Linfocitos B de larga vida.
 - Ausencia de IgD e IgE.
 - Trombocitos fagocíticos.
 - Antígenos de histocompatibilidad B-G y B-F en glóbulos rojos.
-
-

La figura 1 muestra los dos órganos primarios del sistema inmune de las aves; el timo y la bursa de Fabricio, y presenta además, un esquema de la organización de este último órgano. La función de la bursa fue descubierta en 1956 cuando Bruce Glick encontró que las gallinas bursectomizadas muy pronto después del nacimiento, carecían de la capacidad de producir anticuerpos. El descubrimiento funcional del timo, por su parte, ocurrió a principios de la década del 60 cuando investigadores ingleses encontraron que los ratones timectomizados carecen de la capacidad para hacer una respuesta inmune celular, es decir, son incapaces de hacer una reacción de hipersensibilidad retardada (hipersensibilidad cutánea del tipo de la tuberculina), son incapaces de rechazar injertos y además los linfocitos de estos ratones son incapaces de hacer una reacción de injerto contra huésped.

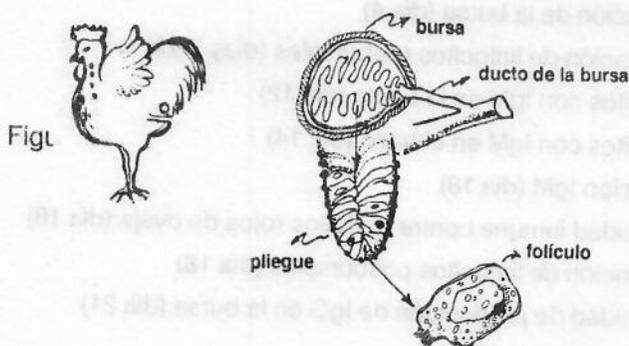


Fig. 1. Representación esquemática de la bursa y el timo de las aves. Nótese el timo multilobulado, la organización en pliegues y foliculos en la bursa y la comunicación entre bursa y cloaca.

Antes del descubrimiento funcional de estos órganos existían algunas hipótesis que los relacionaban con la maduración y el vigor sexuales, debido a la asociación cronológica de la maduración sexual y el mayor tamaño, que no la mayor actividad, de estos órganos. Realmente esta asociación no ha sido explicada convenientemente. También se pensó que el timo estaría asociado con la formación de la cáscara del huevo, debido a la relación

embriológica y anatómica entre este órgano y la glándula paratiroides que algunas veces conduce a fallas en la organogénesis donde se encuentran islotes de células de un órgano enclavadas en el otro, conduciendo todo esto a interpretaciones erradas de las manipulaciones quirúrgicas experimentales.

La tabla 2 presenta un resumen cronológico del desarrollo de sistema inmunológico de la gallina durante la vida embrionaria y después del nacimiento.

Tabla 2. Cronología de la respuesta inmune humoral en las aves.

Período de incubación:

- Formación de la bursa (día 4)
- Inmigración de linfocitos prebursales (días 7-12)
- Linfocitos con IgM en la bursa (día 12)
- Linfocitos con IgM en el bazo (día 14)
- Excreción IgM (día 18)
- Capacidad inmune contra glóbulos rojos de oveja (día 18)
- Emigración de linfocitos posbursales (día 18)
- Capacidad de producción de IgG en la bursa (día 21)

Período postnacimiento:

- Capacidad inmune contra el virus de Newcastle (día 1)
 - Capacidad de producción de IgG en el bazo (día 3)
 - Capacidad inmune contra Salmonella (día 16)
 - Proceso de maduración de linfocitos B terminado (día 28)
 - Máximo tamaño de la bursa (10-15 semanas)
 - Involución total de la bursa (23-25 semanas)
-
-

2. ONTOGENIA Y FUNCION DE LA BURSA DE FABRICIO

La bursa es un órgano linfoepitelial que tiene su origen en una invaginación de tejido endodérmico y ectodérmico a nivel de la región ventral del proctodeo, entre los días cuatro y cinco de incubación. La bursa está compuesta de una capa serosa que la recubre en la parte más exterior y dos capas musculares que se disponen perpendicular u oblicuamente una a la otra; la luz del órgano está compuesta por células epiteliales que se disponen en pliegues, de los cuales existen entre diez y quince. La bursa está conectada con el exterior a través de un ducto que desemboca en la pared dorsal de la cloaca.

Inicialmente se pensó que los linfocitos que aparecen en la bursa entre el día siete y el día catorce de incubación, tenían origen en el mismo tejido epitelial de la bursa o en el saco de la yema. Ahora se sabe que estas células se originan en tejido mesenquimal del embrión y que la migración hacia la bursa y hacia el timo se produce en períodos de tiempo determinados, quizá bajo la influencia de factores quimiotácticos no caracterizados. En la Figura 1 se observa la cronología de la inmigración de linfocitos al timo y a la bursa en la codorniz. En la gallina el período de receptibilidad de la bursa va del día 8 al día 14 y en el caso del timo las olas de inmigración duran 36 horas. Para el momento de la eclosión la bursa ya ha sido completamente poblada, mientras que el timo todavía es susceptible de ser colonizado por linfocitos.

Como mencionamos anteriormente, la gallina fue el modelo donde se pudo determinar la inmigración de linfocitos a la bursa y al timo. Los primeros experimentos en ese sentido fueron hechos por Moore y Owen, en 1965, cuando mediante la producción de parabiontes demostraron que por lo menos algunas de las células linfoides de la bursa provenían del exterior. (La parabiosis consiste en la anastomosis de vasos sanguíneos de dos embriones lo que permite que las células de un embrión circulen en el otro; algo similar se produce naturalmente en terneros mellizos y este fenómeno fue también de importancia en la formulación de las teorías inmunológicas).

Posteriormente Le Douarin y colaboradores, produjeron quimeras entre embriones de gallina y embriones de codorniz, aprovechando que los tejidos embrionarios de estas especies no se rechazan entre sí, mientras que las células de una y otra se pueden distinguir por la morfología del núcleo (ver Figura 2). Para el efecto se practica una bursectomía a un embrión de gallina, por ejemplo, antes del día ocho y se coloca en su lugar una bursa de codorniz extraída de un embrión de menos de siete días, es decir, cuando las bursas ya se han formado, pero antes de que hayan sido invadidas por linfocitos. Posteriormente podremos ver, como en la Figura 2, que las células de la bursa son efectivamente de la codorniz mientras que los linfocitos que la han invadido provienen de la gallina.

Volvamos ahora a los pliegues de la bursa. Cada uno de estos pliegues está poblado por 1000 folículos y cada uno de estos es el producto de la diferenciación y la multiplicación de las células inmigrantes, también llamadas prebursales, de las cuales llegan unas 10 a cada folículo entre los días 8 y 14 de incubación. Los folículos son polihédricos y están limitados entre sí por una membrana basal y hacia la luz de la bursa están cubiertos por tejido epitelial y coronados por el tejido epitelial asociado a los folículos, el cual tiene una gran importancia para el normal desarrollo y funcionamiento de la bursa, como lo veremos más adelante (ver Figuras 3, 4 y 5).

Cada uno de los 10 linfocitos precursores que llegó al folículo da origen a 10.000 linfocitos B periféricos o sea, que cada folículo

contribuye con un millón y cada pliegue con mil millones para entre los 10 a 15 pliegues de la bursa conformar el total de 10.000 millones de linfocitos B que tiene un ave adulta.

En este momento podríamos preguntarnos por qué algunos linfocitos viajan a la bursa mientras que otros lo hacen al timo. La respuesta no se conoce y todo parece indicar que los linfocitos precursores no están especialmente predestinados sino que la calidad de linfocitos B se adquiere al interior de la bursa.

Nos faltaba decir que cada fólculo consta de una zona medular y una zona cortical, separadas por una membrana basal. Aparentemente no existen diferencias entre los linfocitos de uno y otro compartimiento (Figura 6). Además de linfocitos, en la bursa se pueden encontrar macrófagos y células plasmáticas tanto en la corteza como en la médula.

Antes del paso por la bursa los linfocitos no poseen ninguna capacidad de producción de anticuerpos, pero ya en el día 12 de incubación aparecen linfocitos con IgM en el citoplasma y en la superficie, lo cual indica que ya están en capacidad de producir esta clase de inmunoglobina. La capacidad de producir IgG se adquiere también en la bursa en el día 21 de incubación y posteriormente aparece la IgA.

Las células después de su diferenciación en la bursa no requieren más de este órgano para su posterior diferenciación; esto tiene lugar a nivel de bazo y de otros agregados linfoides periféricos cuando el linfocito B se pone en contacto con el antígeno correspondiente.

La capacidad de un linfocito para responder a "tal o cual" determinante antigénico se adquiere precisamente en la bursa, pues al momento de la llegada a este órgano los linfocitos precursores no han rearrreglado los genes de las inmunoglobulinas. Lo anterior se puede explicar en los siguientes términos: el linfocito precursor tiene la información genética necesaria para producir anticuerpos contra todos los determinantes antigénicos posibles, pero para que esta potencialidad se haga efectiva, es necesario que los genes de las cadenas constantes de las inmunoglobulinas se ensamblen

adyacentes a los genes de las cadenas variables (la cadena variable es la que lleva el fragmento que se une al antígeno, por lo tanto es la que determina la especificidad). Aquí, podríamos decir, que es donde radica la importancia mayor de la bursa de Fabricio.

Cada uno de los 10 precursores que llegó a un folículo da origen a 10 especificidades diferentes y en esta forma podríamos calcular contra cuántos determinantes antigénicos es capaz de reaccionar una gallina: si tenemos que a cada folículo llegan 10 linfocitos precursores y cada uno de ellos da origen a 10 especificidades diferentes, tendríamos 100 especificidades por folículo, 100.000 por pliegue y 1 a 1.5 millones en toda la bursa; este sería el máximo número de anticuerpos diferentes que un ave es capaz de producir.

Estos mismos cálculos nos permiten comprender que el ave inmunológicamente competente dispone de clones de 10.000 linfocitos cada uno, con capacidad de responder, cada clon, contra un determinante antigénico dado. Estas células en estado de reposo tienen inmunoglobulina en su citoplasma y en superficie, dirigida contra su antígeno correspondiente; pero mientras la célula no se ponga en contacto con ese antígeno, esta inmunoglobulina no se produce para exportación (fuera de la célula). Estas inmunoglobulinas de superficie sirven de receptor para la interacción entre el linfocito B y su determinante antigénico. En el momento de la respuesta, es decir, cuando se produce la unión con el antígeno, con el macrófago y con el linfocito T, ese clon de linfocitos B se expande dando lugar como ya lo mencionamos, a linfoblastos, células de memoria y células plasmáticas (ver Figura 7). Los linfocitos B predominan en la bursa, en la glándula Harderiana (donde constituyen el 80%) y en las amígdalas cecales (50%).

A este respecto, sin embargo, se ha creado una interesante discusión en los últimos 2 a 3 años; algunos autores consideran que solo la IgM aparece en la bursa y que la IgA y la IgG aparecen en sitios periféricos, sin influencia de la bursa y quizá bajo influencia directa del antígeno respectivo. Las bases para aseverar lo anterior son estudios moleculares que demuestran que sólo o mayoritariamente, se encuentra RNA mensajero de cadenas

pesadas IgM y livianas Lamda en la bursa de Fabricio; y, adicionalmente, por el hecho que los linfocitos B aún a las 5 semanas después del nacimiento son capaces de restablecer la función de las células B en aves bursectomizadas o tratadas con ciclofosfamida.

Como dijimos anteriormente, las aves han servido de modelo para dilucidar la dicotomía de la inmunidad humoral y de la inmunidad celular; ello ha sido posible gracias a la existencia de un lugar específico para la maduración de los linfocitos B, lo cual facilita la manipulación experimental. En primer lugar se puede hacer bursectomía quirúrgica como ya lo mencionamos, desde las 70 horas de incubación; en esta forma se pudo determinar el papel de la bursa y el cronograma ontogénico de los linfocitos B. También se puede hacer bursectomía hormonal a base de testosterona; para el efecto se utiliza una solución de propionato de testosterona en la que se sumergen los huevos embrionados. El efecto de la hormona es sobre el tejido epitelial asociado al folículo; tal parece ser que si no se forma este tejido o si se interfiere con él en alguna forma, la inmigración de los linfocitos no se da o cesa en caso de que ya se haya iniciado.

Existen dos formas adicionales para hacer una bursectomía. A través de sustancias químicas como el mibolerone que es un análogo sintético de la testosterona y tiene el mismo efecto o la ciclofosfamida que ejerce su acción sobre los ácidos nucleicos, pero tiene acción relativamente específica contra los linfocitos B; en este último caso, si se interfiere con los linfocitos B, habrá regresión de la bursa y desaparición del tejido epitelial asociado a los folículos. Esto nos indica pues, que existe una dependencia muy estrecha entre la presencia de linfocitos en la bursa y células epiteliales asociadas a los folículos. Una forma adicional de hacer una bursectomía funcional de la bursa es mediante la aplicación de anticuerpos contra inmunoglobulina M; si recordamos que la primera inmunoglobina que expresan los linfocitos es la M, lo cual ocurre desde el día 12 de incubación, entonces se puede, mediante anticuerpos contra esta molécula, destruir los linfocitos; así el ave tratada será incapaz de producir anticuerpos tanto M como G y A.

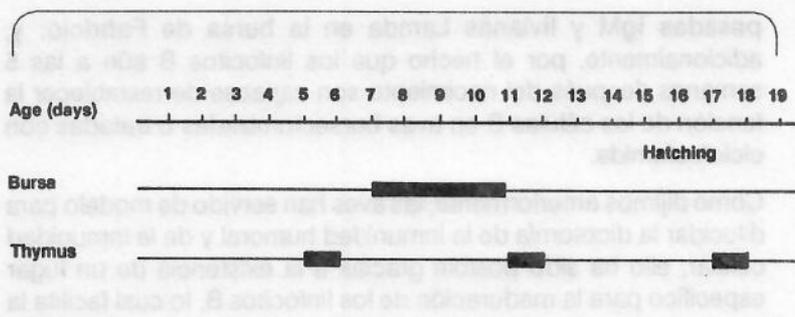


Fig. 1. Cronograma de la colonización linfocitaria de la bursa y del timo en la codorniz.

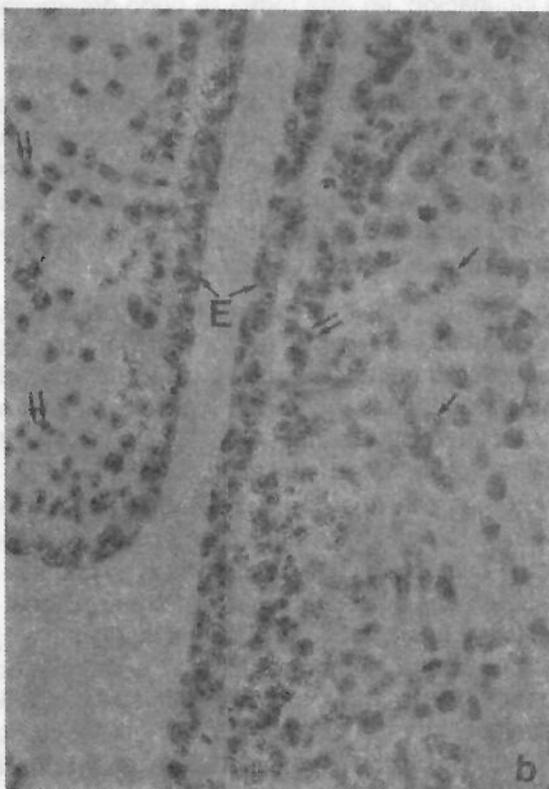


Fig. 2. Demostración de la inmigración de linfocitos a la bursa. Quimera gallina-codorniz, donde la células bursales son de gallina y los linfocitos son de codorniz.

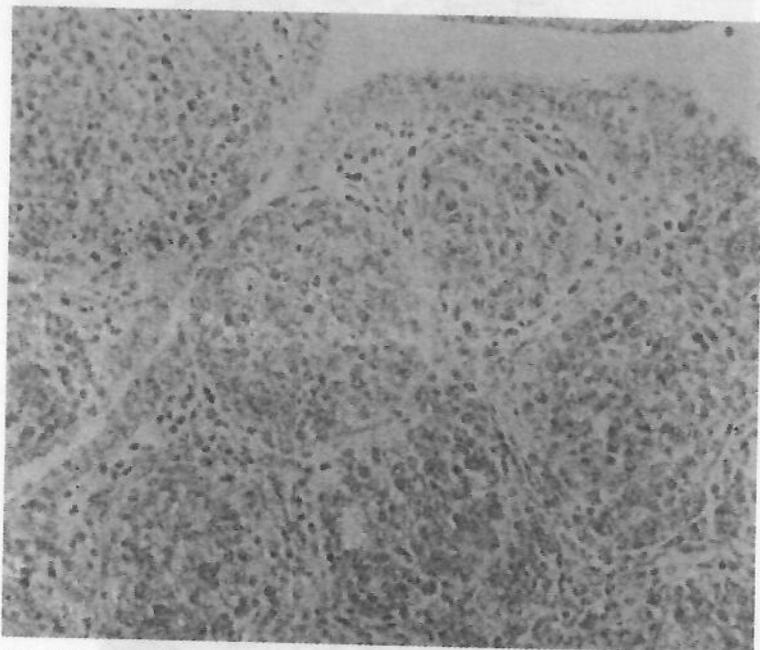


Fig. 3. Bursa de Fabricio de un embrión de gallina los 19 días de incubación. Nótese la organización folicular.

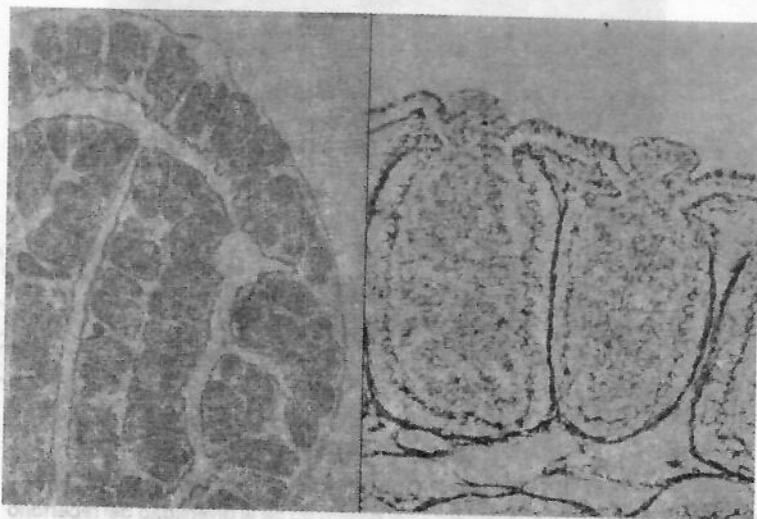


Fig. 4. Bursa de pato de un día de edad. Nótese el arreglo en pliegues, la diferenciación de los folículos y la corona de epitelio asociado a los folículos.

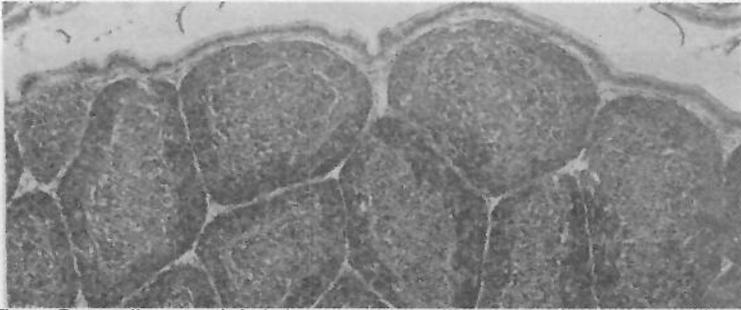


Fig. 5. Desarrollo normal de la bursa en una gallina de 40 días de edad. Nótese la separación de los folículos y la diferenciación de una zona cortical y una zona medular.

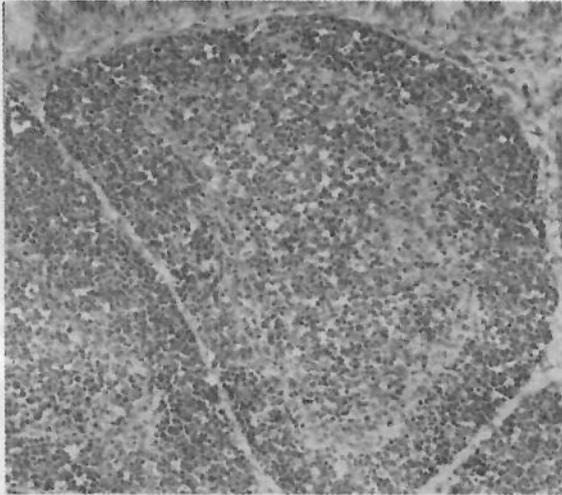


Fig. 6. Estructura normal de un folículo bursal de gallina las 10 semanas de edad.

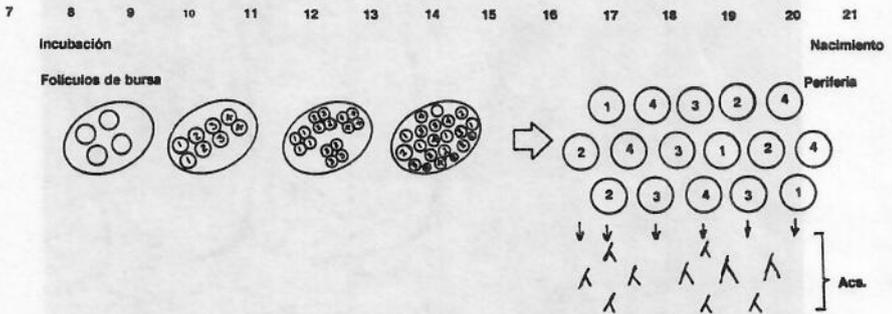


Fig. 7. Representación esquemática del desarrollo de la diversidad del repertorio de anticuerpos en la gallina. Esto tiene lugar en la bursa durante el periodo de incubación.

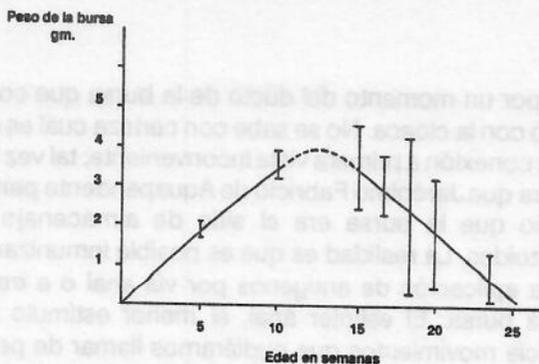


Fig. 8. Crecimiento e involución normales de la bursa de Fabricio de la gallina.



Fig. 9. Involución de la bursa. Nótese la formación de lagunas en los folículos a las 20 semanas de edad y la desaparición de los linfocitos a las 23 semanas.

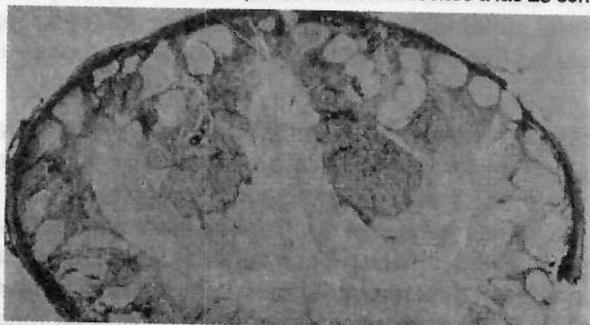


Fig. 10. Corte transversal de la bursa de un pato a las 17 semanas de edad. Sólo algunos linfocitos permanecen intactos y hay hiperplasia del tejido muscular liso y del tejido conectivo.

Hablemos por un momento del ducto de la bursa que conecta a este órgano con la cloaca. No se sabe con certeza cuál es el papel real de esta conexión a primera vista inconveniente; tal vez fue esta la razón para que Jerónimo Fabricio de Aquapendente pensara en un principio que la bursa era el sitio de almacenaje de los espermatozoides. La realidad es que es posible inmunizar un ave mediante la aplicación de antígenos por vía anal o a través del ducto de la bursa. El esfínter anal, al menor estímulo físico o químico inicia movimientos que pudiéramos llamar de peristalsis reversa que puede conducir sustancias y partículas al interior. En estudios experimentales que han utilizado la ligazón del conducto de la bursa han encontrado que las aves experimentales tienen niveles reducidos de anticuerpos naturales contra glóbulos rojos de otras especies y contra la *Escherichia coli*. Lo anterior indica que puede ser a través del ducto de la bursa que el ave logra la estimulación antigénica para producir tales anticuerpos "naturales". Aparentemente este estímulo empieza a ser efectivo desde el día 19 de incubación, cuando comienzan los movimientos respiratorios y con ellos la toma de antígenos a través del ano.

Finalmente debemos mencionar que la bursa crece hasta lograr su máximo peso entre la décima y la décimoquinta semanas, para empezar luego un descenso que continúa hasta la semana 23 - 24 cuando sólo queda un botón fibroso (ver Figuras 8 y 9). Los cambios histológicos asociados con la involución de la bursa empiezan con la presencia de vesículas en los folículos; estas vesículas o quistes crecen hasta llenar todo el folículo y contienen un material mucinoso. Luego desaparece el tejido epitelial asociado a los folículos y finalmente hay fibrosis completa. (Figura 10).

Es interesante señalar que no se ha podido encontrar una asociación entre tamaño relativo de la bursa y mayor eficiencia productiva ni con mayor eficiencia inmunológica. En el mismo sentido se ha demostrado que la brusectomía quirúrgica no interfiere con el crecimiento ni con la ganancia de peso (siempre y cuando el ave se mantenga en condiciones medioambientales controladas. Para terminar este capítulo vale la pena mencionar que algunos estudios han encontrado que además de la bursa pueden existir sitios alternos para la diferenciación de los linfocitos

B. Estos hallazgos se han hecho en aves bursectomizadas a las 60 horas de incubación, en las cuales, contrario a lo esperado, se puede encontrar alguna producción de anticuerpos del tipo IgM. (Si la bursectomía se hace un poco más tarde, cuando el proceso de formación de la bursa ya se ha iniciado, no se encuentra ninguna producción de anticuerpos). Estos estudios esperan confirmación pero ya se ha sugerido que la glándula Harderina podría ser ese sitio alternativo de diferenciación de linfocitos B (más adelante volveremos a este tema). Por otra parte, hay informaciones que indican que la bursa también cumple un papel de órgano inmunológico secundario (a modo de placa de Peyer) después de que ha cumplido su papel primario. A este respecto vale la pena señalar que existe mucha similitud morfológica entre una placa de Peyer y la bursa (como veremos también más adelante).

Addenda para la meditación:

Una publicación de 1987 (Weil y Reynaud del Instituto Jacques Monod de Francia) introduce una interesante discusión acerca del programa ontogénico de los linfocitos B de las aves. En mamíferos las células B se renuevan cada dos a cuatro días a partir de células madres de la médula ósea. Este no es el caso de las aves, donde la bursa sólo es receptiva entre los días 8 y 15 de incubación, de tal suerte que durante este período maduran los linfocitos B y estos deben persistir durante toda la vida; algo similar a lo que ocurre en el timo (tanto en mamíferos como en aves). En otras palabras, la diversidad de las células B en los mamíferos se estaría generando diariamente, mientras que la diversidad de las células B en las aves se genera entre los días 7 y 15. Estos conceptos muy autorizados por cierto, introducen una profunda diferencia en estas especies. En un principio, quizá sin mucho beneficio de inventario, se pensaba que las células B del mamífero diferenciadas a nivel del órgano equivalente de la bursa (el hígado fetal), persistían durante toda la vida del individuo. Todo esto, de paso, nos lleva también al problema de la memoria inmunológica que como se menciona en otra parte de este trabajo, tendrá que ser revaluada, pues no puede

haber memoria inmunológica en células B si estas células se renuevan cada dos a cuatro días. La memoria (toda) tendría que recidir en las células T que si son de larga vida.

Los autores mencionados calculan que a cada folículo de la bursa sólo llegan dos linfocitos (en vez de 10) como lo calcularon otros y que cada uno de ellos sólo da lugar a una especificidad (y no a 10), con lo cual el repertorio del ave sólo sería de 20.000. La diversidad adicional sería el producto, no de nuevas clonas de linfocitos sino del rearrreglo genético a nivel de la cadena variable liviana de la Inmunoglobulina mediante la utilización de pseudogenes cercanos.

Estos son pues, problemas centrales de la inmunología que no están completamente dilucidados y donde las aves están suministrando la información básica para poner a prueba los conceptos preexistentes.

3. ONTOGENIA Y FUNCION DEL TIMO

El timo, como la bursa de Fabricio, es un órgano linfopitelial de origen ectoendodérmico, el primero en aparecer entre todos los órganos linfoides. El primordio del timo hace su aparición al 5o. día de incubación a partir de los segmentos 3 y 4 de la faringe; (en aves más primitivas como el pingüino, y en los reptiles también participa el segundo segmento).

Al día 5.5 ocurre la separación del primordio de la faringe y en un período de 36 horas, entre los días 7.5 y 8.5 tiene lugar la primera ola de invasión de linfocitos, los cuales ya existían desde el día 3.5. Dos nuevas olas de invasión ocurren durante la incubación pero solamente los linfocitos que llegan al final reemplazan totalmente a los primeros. (Como mencionamos anteriormente el carácter de inmigrantes de estos linfocitos se demostró con las quimeras de gallina y codorniz).

Al día 9 aparecen dos lóbulos y al día 10.5 ya existe una cápsula que los cubre y los invade dando lugar a la formación de los lobulillos o folículos. A los 13 días se puede observar una clara demarcación entre las zonas medular y cortical en cada folículo (recordemos que la misma demarcación existe en la bursa, pero en forma mucho más clara que en el timo); a los 15 días hay presencia de corpúsculos de Hassall cuya función no es clara pero están asociados con un timo funcional. (Figuras 1 y 2).

A medida que crece el embrión y se elonga el cuello los dos lóbulos del timo se dividen dando lugar finalmente a un órgano

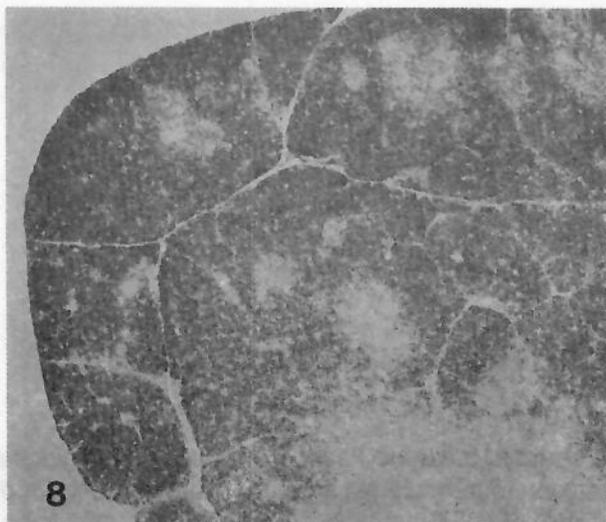


Fig. 1. Estructura normal del timo en gallinas. Nótese la zona cortical más densa y la zona medular menos poblada de linfocitos.

multilobulado (7 lóbulos a cada lado) que se extiende a lo largo del vago y de la yugular, desde la cavidad torácica hasta la tercera vértebra cervical en la gallina o hasta la mandíbula en otras aves como los halcones.

El crecimiento progresivo del timo es más notorio a partir del día 10, con un incremento marcado al momento de la eclosión y en forma sostenida hasta el momento de la maduración sexual. El peso del timo, en condiciones normales se relaciona más con la edad del ave que con su peso corporal.

La corteza del timo está densamente poblada de linfocitos mientras que en la médula la población es menor; los linfocitos de la corteza se consideran inmaduros mientras que los de la médula son los que finalmente dejarán el timo para poblar los órganos linfoides secundarios.

Como dijimos inicialmente, la función del timo ha estado clásicamente relacionada con el rechazo de trasplantes, las reacciones de hipersensibilidad y la reacción de injerto contra huésped. (Esta última consiste en la capacidad de los linfocitos T

maduros, transfundidos de un individuo sano a otro Inmunosuprimido, para rechazar al nuevo huésped). También es función del timo coadyuvar en la respuesta humoral contra algunos antígenos.

Estas funciones, así descritas son un buen resumen de la respuesta inmune celular, pero hoy sabemos mucho más acerca de los mecanismos celulares y moleculares responsables de esas funciones, como lo veremos en el capítulo sobre la fisiología de la respuesta inmune. Aquí debemos señalar sin embargo, que aunque tenemos hoy mayor información todavía no logramos entender a cabalidad ciertos aspectos como los mecanismos de tolerancia contra lo propio, es decir, en condiciones normales, cómo el ave no se destruye así misma; desconocemos los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, los mecanismos de restricción genética del linfocito T, no está completamente claro cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la activación del linfocito T, desconocemos los mecanismos de la memoria inmunológica a nivel del linfocito T y más aún a nivel del linfocito B, etc.

Hasta hace algunos años se pensaba que el timo desaparecía totalmente como ocurre con la bursa; por lo menos en los mamíferos se creía así; pero aparentemente, tanto en aves como en mamíferos el timo permanece funcionalmente durante toda la vida. Es cierto que disminuye el tamaño, principalmente a expensas de la corteza, pero la médula permanece y se cree que las oleadas de linfocitos descritas durante la incubación y al nacimiento se siguen dando durante toda la vida.

Adicionalmente a la función inmune, al timo se le ha demostrado una función hematopoyética con base en la presencia de precursores eritroides muy tempranos.

Otros interrogantes que vale la pena señalar, con relación a la ontogenia y función del timo son los siguientes:

Los linfocitos que inmigran al timo tienen alguna característica especial que los dirige hacia este órgano? cuál es el factor quimiotáctico producido por el timo?

Qué es lo que ocurre en el timo que conduce a la selección y maduración de unos linfocitos que salen a poblar los órganos linfoides secundarios, mientras que otros son retenidos y destruidos?

Cómo “aprenden” los linfocitos a reconocer el complejo mayor de histocompatibilidad de su huésped (necesario para que se produzcan las interacciones celulares que hacen posible tanto la fase inductora como la fase efectora de la respuesta inmune) y de huéspedes alogénicos (para entrar a rechazar un trasplante)?

Los linfocitos de la corteza tímica son altamente susceptibles a los corticoides; es este el agente “selector” de los linfocitos? A propósito, cada vez que ocurren situaciones donde los corticoides están elevados, como es el caso de la maduración sexual, la muda e infecciones, ocurre una relativa y transitoria atrofia tímica. (Figura 3).

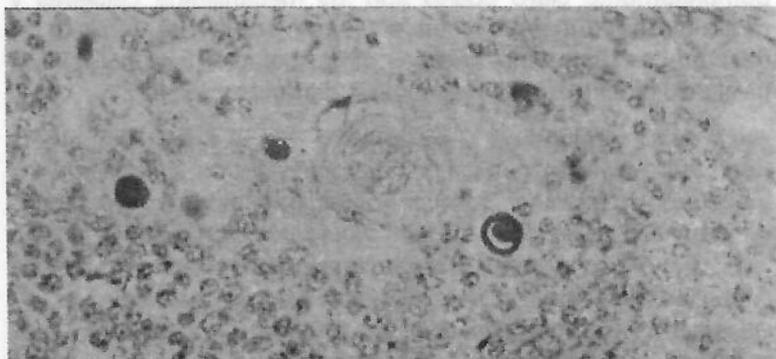


Fig. 2. Timo de pato de 7 días de edad. Nótese un corpúsculo de Hassall.

De todas maneras, desde el día 12 de incubación podemos hablar de linfocitos T en el pollo, pues a esta edad ya se encuentra en la superficie de estas células la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal que es una de las características de esta célula. Desde antes del nacimiento se pueden demostrar linfocitos capaces de efectuar una reacción de injerto contra huésped (más adelante veremos el modelo experimental para probarlo). Al nacimiento los linfocitos T tienen capacidad de rechazar injertos, y de responder

contra mitógenos de linfocitos T como la fitohemaglutinina y la concanavalina A. (La timectomía del ave conduce a no rechazo, no reacción de injerto contra huésped, no reacción de hipersensibilidad retardada y a defecto parcial en la producción de anticuerpos).

Los linfocitos T de las aves a diferencia de los mamíferos no forman rosetas con glóbulos rojos de carnero, tienen receptores Fc y antígenos Ia; pero en común con los mamíferos estos linfocitos responden a mitógenos y no son adherentes (al plástico, al vidrio o al nylon).

Los linfocitos T constituyen el 60-70% de los linfocitos circulantes y el 55% de los linfocitos del bazo. La localización en el bazo ocurre específicamente en las zonas periarteriolas, en la pulpa roja y en los sinusoides. En la bursa existe, dorsal al ducto, un pequeño foco o nido de linfocitos T.

La reacción de hipersensibilidad retardada en aves se puede demostrar con tuberculina, con toxina diftérica, con dinitrofenol y con gamaglobulina humana. La fitohemaglutinina, inoculada en forma intradérmica, da lugar a una infiltración de basófilos similar a la llamada hipersensibilidad basofílica cutánea descrita por algunos autores en mamíferos.

La enfermedad de injerto contra huésped tiene un excelente modelo en las aves: si inoculamos en un embrión en forma intravenosa o en la cavidad alantoidea, linfocitos T alogénicos (de otro individuo de la misma especie) podemos esperar que se presente esplenomegalia y focos de infiltrado linfoide en la membrana corioalantoidea y muerte del embrión en 5 a 6 días. Se trata de un ataque del injerto inoculado, contra las células hematopoyéticas del receptor. Esto se da también en forma natural por intercambio de linfocitos al momento del parto en placentados, por ingestión de linfocitos en el calostro o en la medicina moderna por trasplante de médula ósea o en menor escala por trasplante de pulmón e hígado.

La inmunidad celular del ave también es susceptible de estudio con el cultivo mixto de linfocitos in vitro; se trata ni más ni menos que de un modelo de la reacción de rechazo o de injerto contra

huésped. Los linfocitos de un individuo mezclados en el mismo tubo de ensayo con linfocitos de otro individuo alogénico, reaccionan con proliferación acelerada al reconocer los antígenos de histocompatibilidad extraños.

Los linfocitos T citotóxicos, los encargados de la detección y la destrucción de células infectadas por virus o células tumorales también existen en las aves. De ellos se sabe que están restringidos genéticamente lo que equivale a decir que sólo reconocen y destruyen células modificadas del mismo huésped o de otro muy parecido desde el punto de vista de la histocompatibilidad. Como dejamos implícito anteriormente, el sistema inmune tiene que reconocer tanto lo extraño como lo propio!

Finalmente, la función de los linfocitos T tiene que ver con la activación de los macrófagos. Los monocitos y macrófagos pueden fagocitar y destruir agentes invasores en forma inespecífica, pero esa función es mucho más eficiente cuando los macrófagos, bajo la influencia de linfoquinas (que son el producto de la respuesta inmune celular, como los anticuerpos son el producto de la respuesta inmune humoral), logran un estado de activación que conlleva un aumento de tamaño, de actividad metabólica y de capacidad destructora. La principal linfoquina involucrada en este proceso parece ser el interferón gamma.

Una función adicional que clásicamente se le ha atribuido a los linfocitos T es la regulación de la respuesta inmune a través de las células supresoras. Estas células supresoras descritas tanto en mamíferos como en aves han sido fuertemente desacreditadas en los últimos meses. Todo parece indicar que tales células T supresoras no existen y que para explicar la regulación de la respuesta tendremos que pensar en otros mecanismos como la red idiotípica y en los macrófagos a través, estos últimos, de la producción de prostaglandinas como principal mediador de regulación negativa.

A nivel intratímico en el ave se conoce muy poco, pero en mamíferos se han descrito varias series de células (reticulares y monocíticas) con las cuales los linfocito T, en proceso de diferenciación, estaría estrechamente relacionados. Se describen rosetas de linfocitos T en estrecho contacto con esos macrófagos,

pero nada se sabe acerca del tipo de información que estas células estarían intercambiando.

En mamíferos hablamos de linfocitos CD4 y CD8 refiriéndonos a marcadores de superficie que han llegado a reconocerse mediante anticuerpos monoclonales. En aves el reconocimiento de subpoblaciones similares de linfocitos apenas está empezando y todo parece indicar que en aves existe una división similar. Los anticuerpos monoclonales CTLA 3,4 (Chicken T lymphocyte Antigen) reconocen una población de linfocitos T homóloga a los linfocitos CD8 del mamífero y el monoclonal CTLA 1 y 6 reconocen la subpoblación homóloga de CD4. Con estos instrumentos se ha logrado hacer una primera aproximación a una pregunta de muchos años atrás: el virus de la enfermedad de Marek que ataca linfocitos T afecta los linfocitos ayudadores o los linfocitos citotóxicos? Todo parece indicar que los afectados son los linfocitos ayudadores y esto aumenta la similitud fisiopatológica entre la enfermedad de Marek de la gallina y la infección con el virus de la Inmunodeficiencia Humana.

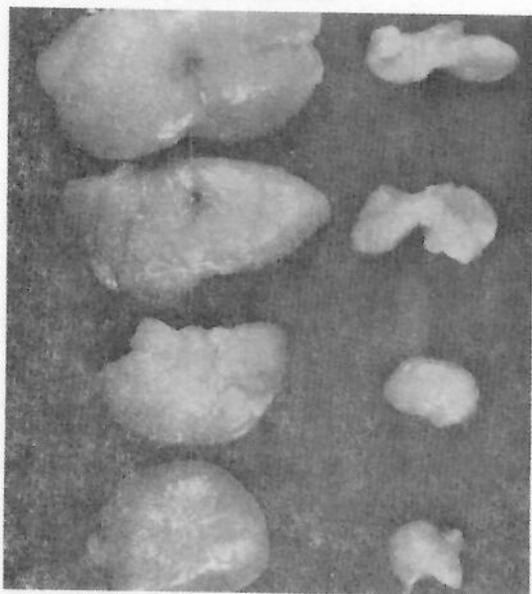


Fig. 3. Atrofia de los lóbulos del timo en gallinas, 5 días después de la inoculación con *E. coli*. Compárese con el control no inoculado a la izquierda.

pero nada se sabe acerca del tipo de información que estas células
están intercambiando.

En nuestros trabajos de linfocitos CD4 y CD8 relacionados a
marcadores de superficie que han llevado a reconocer mediante
anticuerpos monoclonales. En aves el reconocimiento de
subpoblaciones similares de linfocitos parece estar asociado y
todo parece indicar que en aves existe una división similar. Los
anticuerpos monoclonales CTLA 3,4 (Clon T y proglucosa
Antigen) reconocen una población de linfocitos T homólogos a los
linfocitos CD8 del manillar y el monoclonal CTLA 1 y 8 reconocen
la subpoblación homóloga de CD4. Con estos instrumentos se ha
logrado hacer una primera aproximación a una primera de
nuevos años atrás: el virus de la enfermedad de Marek que afecta
linfocitos T afecta los linfocitos ayudadores o los linfocitos
citotóxicos? Todo parece indicar que los efectos son los
linfocitos ayudadores y esto aumenta la intensidad histológica
entre la enfermedad de Marek de la gallina y la infección con el
virus de la inmunodeficiencia Humana.

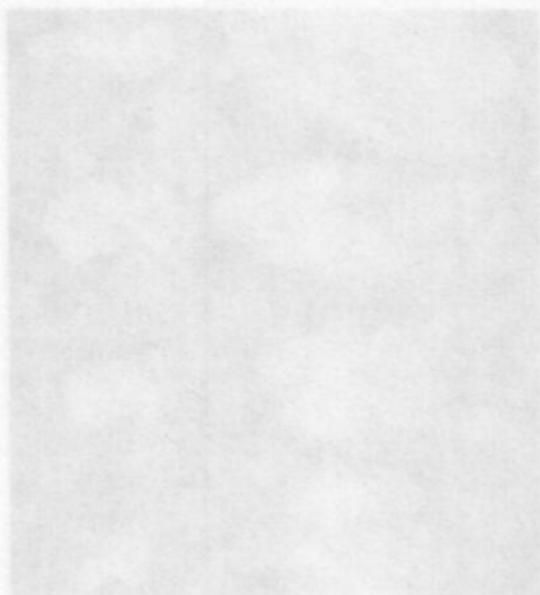


Fig. 2. Análisis de los niveles del virus en Gallinas. 2 días después de la infección
con E. coli. Compararse con el control no infectado a la izquierda.

4. FASE INDUCTORA DE LA RESPUESTA INMUNE

En este capítulo voy a tratar de cubrir los conceptos relacionados con antígenos, órganos infoides secundarios, el complejo mayor de histocompatibilidad, la fisiología de la respuesta inmune y la inmunidad de las mucosas o respuesta inmune secretoria. Con estos conceptos podremos dar una respuesta inicial a tres grandes interrogantes: CUANDO, DONDE y COMO tiene lugar la respuesta inmune.

4.1 Antígenos

Con el término antígeno se define a toda sustancia capaz de inducir una respuesta inmune humoral o celular, en un huésped inmunocompetente. Clásicamente se ha considerado a las proteínas como a los mejores antígenos y ello se debe a su alto peso molecular y a su complejidad estructural; sin embargo, los carbohidratos y los lípidos también pueden ser antígenos (la combinación de estos compuestos como en una glicoproteína o un glicolípido generalmente resulta en mejoría de la capacidad antigénica).

Normalmente las sustancias propias del organismo no son buenos antígenos (excepto en problemas de autoinmunidad y entonces hablamos de autoantígenos); la razón, como ya lo discutimos en el capítulo anterior, es que los linfocitos a su paso por el timo "aprenden" a tolerar lo propio para evitar el "horror autotóxico" o

autoinmunidad; adicionalmente en el timo "aprenden" los linfocitos a reconocer lo propio para poder efectuar posteriormente todas las interacciones celulares necesarias en la fase inductora y en la fase efectora de la respuesta inmune, como veremos más adelante.

Un microorganismo, así sea el menos complejo, como un virus, por ejemplo, está compuesto de varias proteínas, glicoproteínas, nucleoproteínas y en algunos casos lípidos, si se trata de un virus con envoltura como el de New Castle. De esta manera, un ave infectada debe producir una respuesta contra cada uno de estos antígenos.

Pero recordemos en este momento que cada uno de los componentes del virus, digamos una glicoproteína está compuesta de múltiples residuos de aminoácidos y de cadenas de carbohidratos y que esos residuos se organizan tridimensionalmente en el espacio dando lugar a una estructura muy compleja. Contra esta sola estructura vamos a tener múltiples respuestas inmunes pues un linfocito B o T sólo es capaz de reconocer una pequeña parte de dicha estructura (digamos entre 6 y 10 aminoácidos) de tal manera que teóricamente podríamos tener 34 respuestas diferentes contra una proteína de 340 aminoácidos.

El anterior no es un cálculo real; pueden ser más o menos, pero el ejemplo es válido para comprender que la respuesta inmune es un proceso muy costoso y posiblemente redundante y exagerado.

Si recordamos la teoría de la selección clonal de Burnet, que sigue siendo la teoría fundamental del pensamiento inmunológico, podemos entender que un linfocito de aquellos que maduraron en la bursa o en el timo, sólo reacciona y es capaz de proliferar cuando se pone en contacto con su antígeno específico (aquí entendemos por antígeno específico, el pequeño pedacito de la proteína y nada más). En forma más apropiada debemos llamar a este pequeño pedazo del antígeno determinante antigénico.

Las preguntas que podemos formularnos en este momento son las siguientes: para qué tantas respuestas? serán todas necesarias? serán todas convenientes? actuarán todas en defensa

del huésped?. La aspiración del autor es que la lectura de este trabajo deje una respuesta clara, si bien nunca definitiva, a estos interrogantes.

Digamos, en resumen, para responder a la pregunta CUANDO se produce la respuesta inmune, que ella ocurre cuando un huésped maduro e inmunocompetente se pone en contacto con un antígeno (esto a nivel del huésped); pero a nivel celular podemos decir que un linfocito responde inmunológicamente CUANDO se pone en contacto, en forma apropiada (esto lo explicaremos más tarde) con su determinante antigénico respectivo. Estos conceptos básicos y simples nos serán de gran utilidad para estudiar la fisiología de la respuesta inmune.

4.2 Organos Linfoides Periféricos

Clásicamente se consideran órganos primarios o centrales del sistema inmunológico a la médula ósea, el timo y a la bursa; ello es cierto para mamíferos y aves por igual. La función de estos órganos centrales es la generación (médula) y la diferenciación (timo y bursa) de linfocitos. Una vez cumplida esta función, los linfocitos deben migrar a los órganos linfoides periféricos (o secundarios) donde estas células esperarán el contacto con sus antígenos respectivos. Como se menciona en otra parte de este capítulo, las células migran a sitios específicos: los linfocitos T a áreas llamadas timo-dependientes y los B a áreas burso-dependientes, en un proceso de migración dirigida a través de receptores presentes en las células endoteliales de algunas vénulas.

En las aves son órganos linfoides secundarios los siguientes: el bazo, el GALT (tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal), la glándula Harderiana y la glándula pineal. No existen ganglios linfáticos en la gallina como existen en los mamíferos; solo agregados linfoides organizados en folículos, pero sin cápsula, sin hilo y sin vasos linfáticos mayores.

A nivel gastrointestinal debemos distinguir las placas de Peyer, las amígdalas cecales, algunos agregados linfoides en urodeo y proctodeo y algunos autores consideran que también la bursa de Fabricio pertenece en este conjunto, principalmente después del

nacimiento cuando se considera que la bursa ya ha cumplido con su función central y sigue cumpliendo un papel de órgano secundario hasta su involución total. (Figuras 4 y 5).

Las células linfoides de las placas de Peyer están separadas de la luz intestinal por una membrana de células M (células con Microvellocidades) las cuales permiten el paso de algunas partículas y antígenos que entran en contacto inmediato con los linfocitos a este nivel. Las tonsilas o amígdalas cecales son dos agregados linfoides que vigilan la entrada (o salida) de los ciegos y tienen características similares a las de las placas de Peyer. En aves de 12 semanas se encuentran hasta 5 ó 6 placas de Peyer, mientras que en aves mayores se encuentra solamente una placa a nivel de la unión ileoceal. En algunas especies como el pato, las placas de Peyer son anulares, es decir que más que una placa son un anillo linfoide que cubre toda la pared del intestino.

Desde hace muchos años se había sugerido que la glándula pineal (sin una función definida pero asociada con desarreglos del crecimiento somático o con hiperactividad sexual) era un agregado linfoide en las aves, con células T y B y con capacidad de producción de anticuerpos (Figura 6). Finalmente, la glándula Harderiana (presente en el tercer párpado) contiene un agregado de células plasmáticas y en las aves se considera que es el mayor agregado de células plasmáticas conocido. No se sabe con seguridad si las células de la glándula Harderiana son inmigrantes y existen evidencias de que la diferenciación blástica tiene lugar allí mismo; se ha sugerido también que esta glándula pudiera suministrar el micromedio ambiente necesario para la diferenciación de células B, pues recordemos que una bursectomía muy temprana (60 horas de incubación) no resulta, como se esperaría, en una completa ausencia de células B. La glándula Harderiana podría ser como se mencionó anteriormente, el órgano alterno para esta función. La última información conocida por el autor a este respecto, señala que las células de esta glándula producen principalmente IgA (48%) e IgG (22%); sólo unas pocas producen IgM (12%). Los investigadores concluyen que la glándula Harderiana podría ser un sitio de maduración postbursal de las células B. (Figura 7).

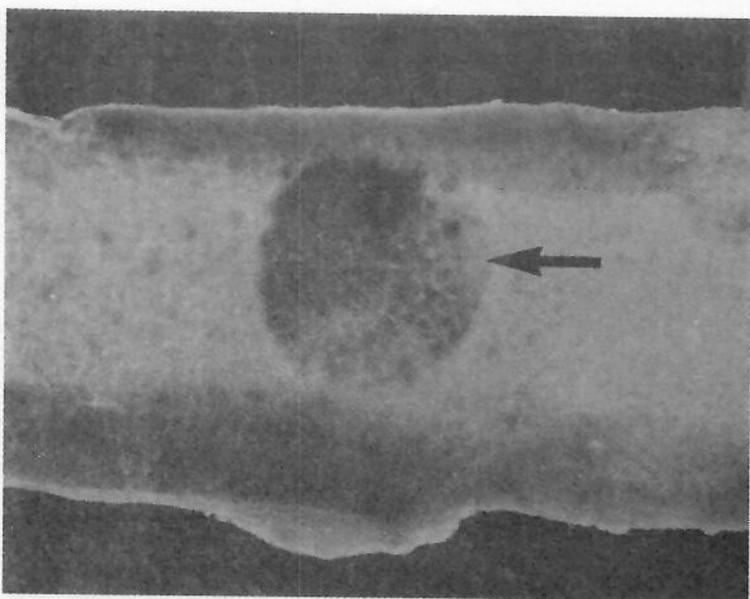


Fig. 1. Placa de Peyer en el íleon de una gallina de 5 semanas de edad.

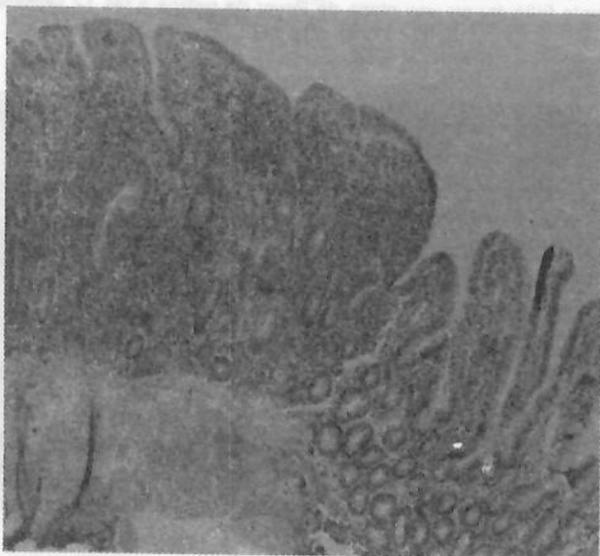


Fig. 2. Perfil histológico de una placa de Peyer de gallina, a los 12 semanas de edad. Nótese las vellosidades normales a la derecha.

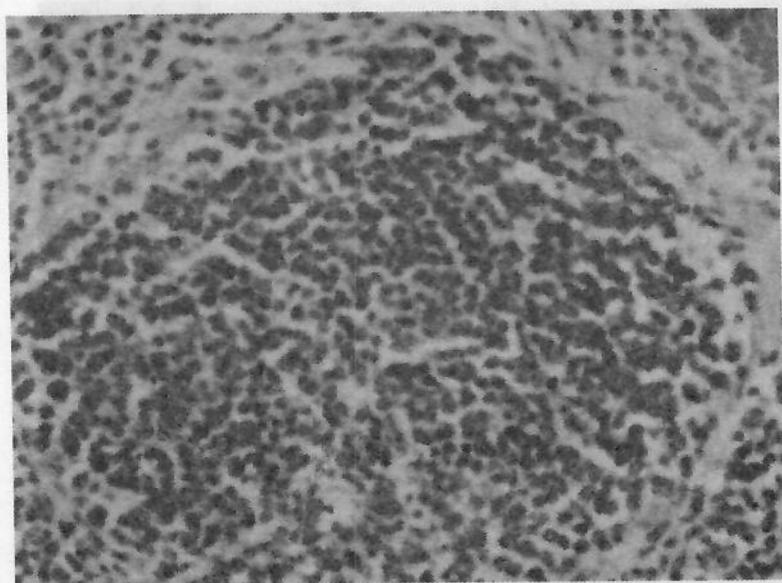


Fig. 3. Arreglo folicular en una placa de Peyer de gallina a las 12 semanas de edad.

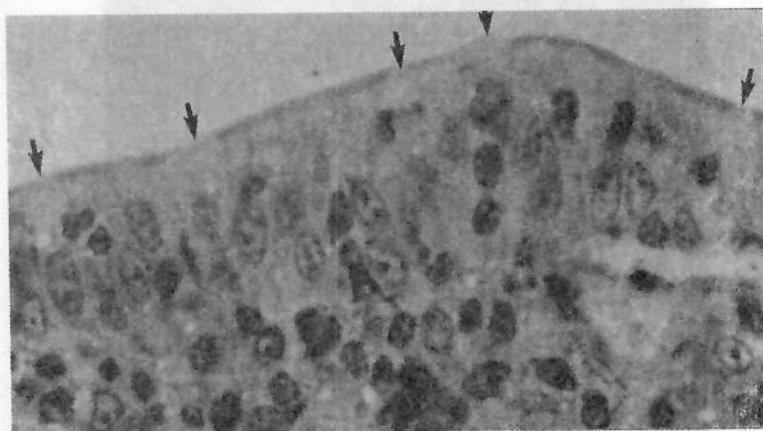


Fig. 4. Histología de la mucosa intestinal a nivel de la placa de Peyer. Nótese la elevación de la mucosa y la presencia de células M.

En resumen, para responder a la pregunta DONDE ocurre la respuesta inmune, digamos que esta puede ocurrir, o por lo menos iniciarse, en cualquier parte del organismo, pero principalmente en los órganos linfoides periféricos que son los sitios donde los linfocitos maduros se encuentran "acuartelados" a la espera de su determinante antigénico para iniciar una respuesta.

4.3 El Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El concepto del complejo mayor de histocompatibilidad empezó a aclararse en el ratón a partir de los últimos años de la década de los años 40, cuando se demostró la base genética del rechazo de injertos. Se trata de un complejo genético presente en el cromosoma 17 del ratón (H-2) y en el 6 del humano (HLA) que codifica por proteínas de superficie celular. Este es un sistema genético muy polimórfico de tal suerte que encontrar dos individuos al azar que sean portadores de la misma información genética a este nivel es un evento muy poco probable. En mellizos idénticos sí se espera que esta información sea la misma y los hermanos no idénticos se espera que compartan parcialmente esta información.

Podríamos decir que los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad son los marcadores de la individualidad biológica de un sujeto, y consecuentemente estos son los antígenos que determinan el rechazo de un órgano extraño. Asociada a esta función de rechazo de lo no propio, el complejo mayor de histocompatibilidad también contiene información relacionada con la mayor o menor capacidad que tiene un individuo para producir una respuesta inmune contra un antígeno determinado.

El complejo mayor de histocompatibilidad se ha encontrado en todas las especies que se han estudiado: BoLA, en bovinos (bovine leukocyte antigens); ELA, en el equino (equine leukocyte Antigens); Complejo B en la gallina. En la gallina el complejo consta de 3 loci: B-G que codifica para antígenos presentes en los glóbulos rojos; B-L que son los antígenos correspondientes a los antígenos clase II en el hombre y están presentes en monocitos,

en macrófagos, en linfocitos B y en linfocitos T activados; finalmente, B-F que corresponden a los antígenos de clase I y se expresan en glóbulos rojos y en linfocitos.

Los antígenos B-F empiezan a aparecer al momento del nacimiento y aumentan progresivamente hasta el día noveno de edad. En el timo los linfocitos de la médula adquieren estos antígenos mientras que los de la corteza permanecen negativos. Funcionalmente, se ha demostrado que solo los linfocitos T, B-F positivos tienen capacidad de efectuar una respuesta de injerto contra huésped; con lo cual se demuestra que estos antígenos en los linfocitos T son indicadores de la maduración ontogénica de la célula. En la práctica veterinaria podemos ver mucho más claramente la importancia práctica del complejo mayor de histocompatibilidad si consideramos el caso de las gallinas resistentes a la enfermedad de Marek; la resistencia está asociada con la información genética a nivel de este complejo, específicamente a nivel del locus B-F; las gallinas B-F21 son altamente resistentes, mientras que las B-F19 son altamente susceptibles. Otras funciones importantes del complejo B en la respuesta inmune serán mencionadas en el capítulo sobre fisiología de la respuesta inmune.

4.4 Fisiología de la Respuesta Inmune

Habiendo analizado el origen, la localización y la diferenciación de los principales actores de la respuesta inmune: los linfocitos T y B; conociendo su especificidad por los determinantes antigénicos y el reconocimiento de lo propio a través de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, concentremos la atención en la tercera pregunta que nos hemos formulado: COMO tiene lugar la respuesta inmune.

En forma natural los antígenos penetran en un huésped a través de las mucosas, principalmente. A este nivel actúan una serie de mecanismos de defensa, no específicos que incluyen factores físicos como el estornudo, químicos como pH y las enzimas hidrolíticas y biológicos como la competencia microbiana, que eventualmente impiden el progreso de una infección.

Las primeras células en llegar al sitio de la injuria son los heterófilos (que son el equivalente de los neutrófilos de los mamíferos) y luego los monocitos/macrófagos. Estas células tienen la función de fagocitar y destruir el invasor y a la vez enviar señales quimiotácticas que atraen más células al sitio de la agresión, dando lugar a la respuesta inflamatoria clásica, con vasodilatación que facilita la movilización de células y con la liberación de factores que inhiben temporalmente la migración de las células atraídas. Seguramente aquí terminan la gran mayoría de intentos de colonización por parte de los microorganismos, pero este sería solo el comienzo de una verdadera respuesta inmune.

Los monocitos/macrófagos además de fagocitar el antígeno y posiblemente destruirlo mediante la acción de enzimas presentes en los lisosomas que se fusionan con los fagosomas o vesículas fagocíticas donde se encuentra el parásito o la sustancia extraña (no necesariamente un agente vivo), tienen la función principal de procesar este antígeno y presentarlo en forma de determinantes antigénicos a los linfocitos T ayudadores para iniciar la respuesta inmune, propiamente dicha.

Los determinantes antigénicos, después del procesamiento dentro del macrófago se expresan en la superficie de esta célula y aquí puede el linfocito hacer el contacto generador de la respuesta: ese contacto ocurre mediante el reconocimiento de los antígenos propios a nivel del locus B-L del complejo mayor de histocompatibilidad y mediante la unión ligando-receptor del determinante antigénico con el receptor del linfocito T. En este momento, la célula presentadora de antígeno produce interleuquina 1 que tiene la función de activar en el linfocito T la producción del receptor para la interleuquina 2 y activar además la producción de interleuquina 2 que actúa en forma autocrina sobre esta misma célula conduciendo a un proceso de linfoproliferación mediante el cual este clon respondedor de linfocitos aumenta en número para originar luego las demás funciones de la respuesta inmune como veremos a continuación. Pero antes subrayamos el concepto del reconocimiento de los antígenos B-L; estos antígenos son el equivalente de los antígenos de clase II de los mamíferos y se expresan principalmente en macrófagos, pero también en linfocitos T y B activados y en células

dendríticas; todas estas células tendrían capacidad de actuar como presentadoras de antígeno. Esta función de presentación solo se puede dar, entonces, entre célula presentadora y linfocito T del mismo huésped o quizá entre huéspedes relacionados entre sí, que compartan la misma información genética a este nivel; como los mellizos idénticos, con toda probabilidad o los hermanos no idénticos, con una probabilidad menor.

El linfocito T ayudador, ya activado interactúa con el linfocito B, para dar lugar a la producción de anticuerpos y con linfocitos T para dar lugar a células citotóxicas. En este punto todavía persiste un aire de misterio, pues exactamente no se sabe como ocurren todas estas interacciones, pero el resultado final sí se conoce: anticuerpos, citoquinas y células citotóxicas. A propósito de citoquinas, además de las dos mencionadas (la interleuquina 1 y la interleuquina 2), también se ha caracterizado en aves el interferón gamma. En mamíferos se han caracterizado hasta la fecha 8 interleuquinas con funciones muy variadas sobre el control de la respuesta inmune y sobre células hematopoyéticas; seguramente estas mismas interleuquinas o sus equivalentes serán descritas para las aves en un futuro. Finalmente a este respecto digamos que la interleuquina 2, llamada inicialmente factor de crecimiento de las células T tiene las mismas características moleculares y funcionales como en los mamíferos, pero existe especificidad; es decir que los linfocitos de mamífero no se estimulan con interleuquina 2 de ave, ni a la inversa.

Después de esta fase inductora de la respuesta inmune deben existir mecanismos reguladores de la misma; de otra manera el proceso continuaría en forma innecesaria y eventualmente nociva. Mucho se ha estudiado el mecanismo de supresión y relativamente poco se sabe todavía. Como se mencionó en un capítulo anterior, las células T supresoras que durante varios años fueron una explicación aceptable, han caído en descrédito al no poderse comprobar su existencia; de todas maneras el efecto si es claro: la respuesta inmune es regulada.

Los macrófagos aparentemente tienen un papel importante en la regulación, a través de la producción de prostaglandinas, pero el énfasis mayor en la actualidad lo tienen los anticuerpos

anti-idiotípicos, que son verdaderos anticuerpos dirigidos contra el idiotipo de las inmunoglobulinas (el idiotipo es aquella fracción de la molécula que interactúa con el determinante antigénico). Según esta teoría propuesta por Jerne, cada anticuerpo que se produzca evoca un contra-anticuerpo (o anticuerpo anti-idiotípico) que regula su producción. Este concepto, revolucionario y no bien comprendido aún, ya está siendo utilizado en soluciones prácticas al problema de la inmunoprevención, como lo veremos para el modelo de la *Eimeria tenella*.

4.5 El Sistema Inmune Secretorio.

Las mucosas representan la mayor superficie del organismo expuestas al contacto con el medio ambiente y, consecuentemente son la principal puerta de entrada para el mayor número de infecciones parasitarias, bacterianas, micóticas y virales.

La investigación inmunológica ha dedicado un amplio espacio al estudio de los mecanismos de defensa a nivel de las mucosas, encontrando particularidades que en su conjunto conforman la llamada inmunidad de las mucosas o inmunidad secretoria. No se trata pues de otro sistema inmune sino de las particularidades o adaptaciones del mismo al medio ambiente peculiar de tejidos que cubren las cavidades respiratoria, alimenticia, genitourinaria y ocular.

La particularidad mayor tiene que ver con el predominio de IgA, llamada secretoria, que es un polímero de IgA unido por una cadena J y provisto además de una cadena secretoria que le confiere resistencia contra las proteasas, presentes a este nivel. Ese predominio de la IgA se explica por la recirculación de las células linfoides; las células B que hacen su contacto con antígenos a nivel de las mucosas viajan por los conductos linfáticos hasta la circulación sanguínea a través del ducto torácico. De la circulación las células regresan a las mucosas en forma "dirigida" mediante receptores especiales que se encuentran presentes solo a nivel de endotelios en el área de las mucosas. Hasta el presente estos receptores en las mucosas son hipotéticos, pero a otros niveles ya se han caracterizado molecularmente.

En las aves, además de la producción local de IgA existe un mecanismo peculiar que permite la filtración a nivel del hígado, de la inmunoglobulina A del suero y la concentración de la misma en la vesícula biliar (de esta norma se exceptúa la paloma que carece de vesícula). La concentración de IgA en bilis es hasta 10 veces la del plasma. Existen dos canalículos biliares en la gallina; uno que drena el lóbulo izquierdo directamente en el duodeno y otro que drena el lóbulo derecho a través de la vesícula biliar.

Si experimentalmente se ligan estos ductos, se incrementa los niveles de IgA en el plasma hasta cuatro veces por encima de lo normal; lo cual unido a la observación que IgA radiomarcada inyectada en el plasma se concentra en la bilis, ha constituido la base para deducir esta peculiaridad de las aves. También se ha sugerido que, por lo menos parte de esta IgA biliar es producida in situ por un folículo linfóide presente en la vesícula (Figura 8).

En patos, los pocos estudios que se han realizado hasta el presente indican que existe una IgM no convencional, con determinantes diferentes a la IgM sérica; posiblemente se trata también de IgA que en el pato no ha sido caracterizada en forma apropiada. En pavos, como en gallinas la IgA se ha encontrado concentrada en la bilis.

Pero no son las células plasmáticas productoras de IgA y la IgA misma, los únicos elementos de la inmunidad secretoria; también se encuentran a este nivel linfocitos T, macrófagos, polimorfonucleares, mastocitos y células NK. En mamíferos se han encontrado a nivel del tracto digestivo, los llamados linfocitos T intraepiteliales, la mayoría de los cuales tendrían una función supresora y serían los responsables del fenómeno de Tolerancia Oral.

En 1987 y 1988 se publicaron un par de trabajos sobre la caracterización de fagocitos a nivel pulmonar en la gallina. Según estos investigadores, los fagocitos no son células muy abundantes en el tracto respiratorio normal de la gallina, lo cual podría explicar, en parte, la gran incidencia de neumonías y saculitis en esta especie. En pavos se había demostrado que el adyuvante completo de Freund, aplicado directamente en los sacos aéreos, induce migración de macrófagos al tracto respiratorio; la vía

intravenosa o mediante aerosol no fueron muy eficientes para lograr este efecto, como tampoco lo fue un aerosol de proteosa peptona. La aplicación intravenosa o intratraqueal de *Propionibacter acnes* sí indujo una fuerte respuesta de fagocitos, lo mismo que la *E. coli* y la *P. multocida*. El número de fagocitos atraídos a la cavidad pulmonar fue entre 50 y 100 veces el número de células basales; pero además del número, aumentó la capacidad fagocítica medida con esferas fluorescentes y con la ayuda del citofluorómetro. (Figura 9).

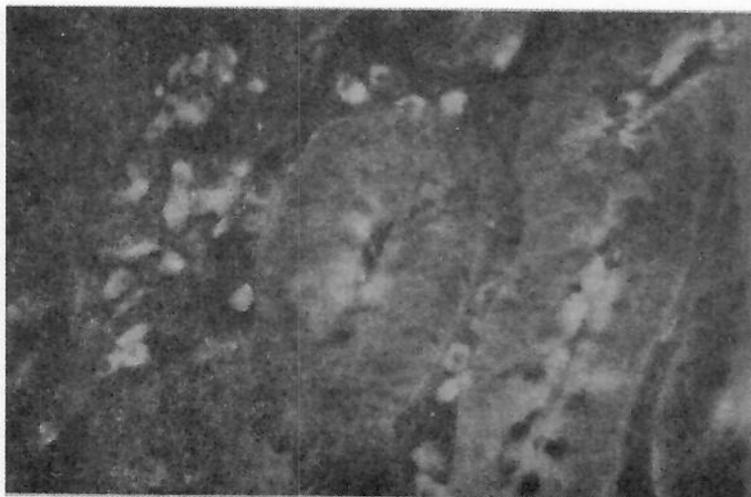


Fig. 5. Corte de ciego de gallina coloreado con anti-IgA de conejo conjugada con fluoresceína. Nótese la frecuencia y la distribución de células plasmáticas productoras de IgA.

intravenosa o mediante sereno no fueron muy eficientes para lograr este efecto, como tampoco lo fue un sereno de propanolol. La aplicación intravenosa o intratecal de propanolol, a dosis de 1 mg/kg, produjo una respuesta de lactosa lo mismo que la *E. coli* y la *P. multocida*. El número de lactosa en la cavidad pulmonar fue entre 50 y 100 veces el número de células basales, pero además del número, aumentó la capacidad lactosa media con estas bacterias y con la ayuda del coliforme (Figura 5).

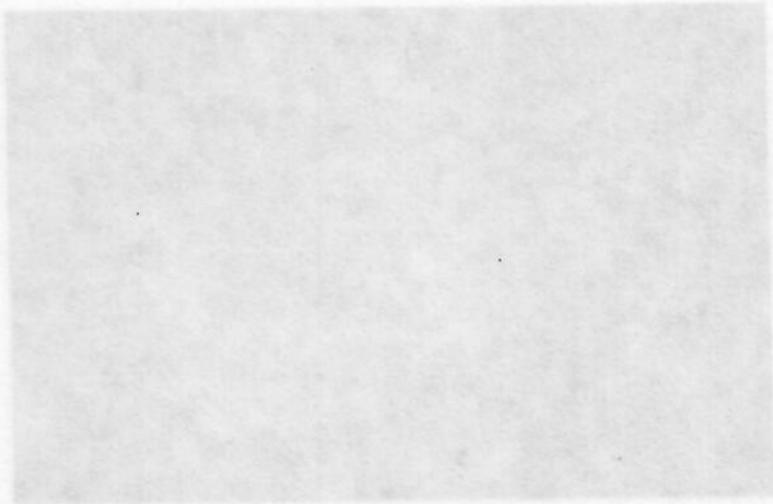


Fig. 5. Curva de lactosa de células colonizadas con *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Nota la frecuencia y la intensidad de células basales productoras de lactosa.

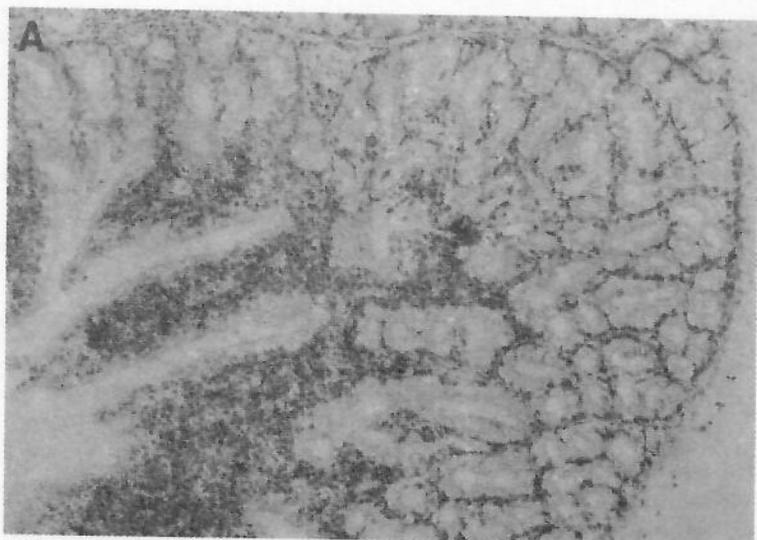


Fig. 8. Autoradiografía de la glándula Harderiana de la gallina. Alrededor de un gran ducto se encuentra una densa población de células productoras de IgM. Preparación con una sonda de DNA marcado con azufre 35.

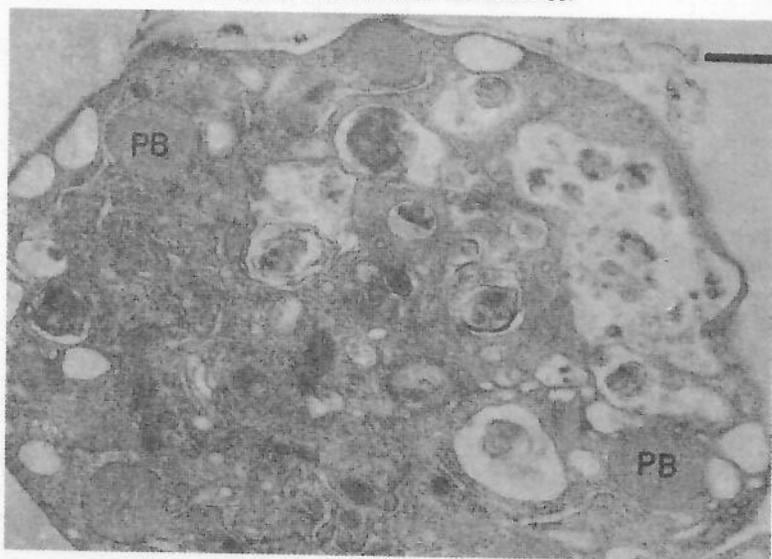


Fig. 9. Macrófago alveolar de gallina obtenido mediante lavado pulmonar. Nótese partículas de poliestireno en el interior de la célula (PB).

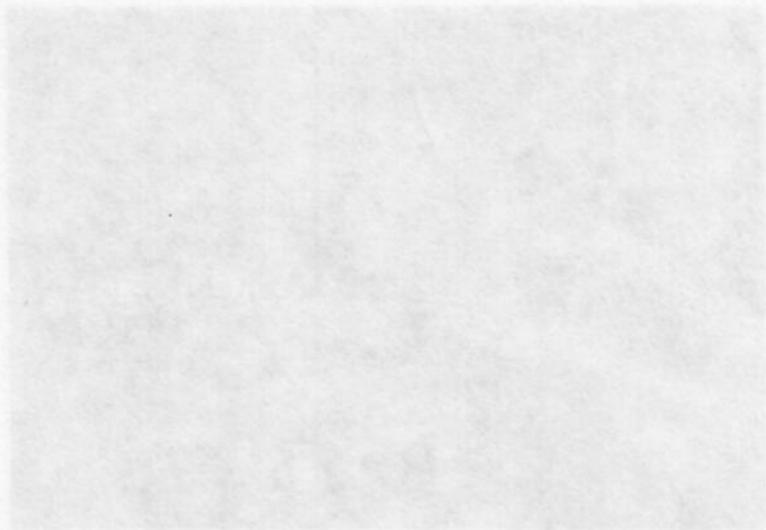


Fig. 5. Anomalous behavior of the system in the presence of the inhibitor. The system is shown in the presence of the inhibitor. The system is shown in the presence of the inhibitor.

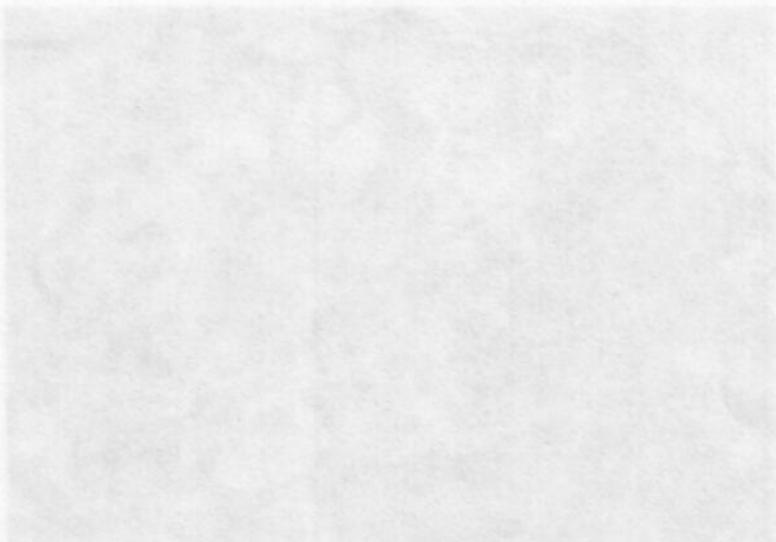


Fig. 6. Micrograph showing the behavior of the system in the presence of the inhibitor. The system is shown in the presence of the inhibitor.

5. FASE EFECTORA DE LA RESPUESTA INMUNE

Ahora tratemos de responder a la pregunta: Cómo es que finalmente el sistema inmunológico destruye o inactiva sustancias extrañas, microorganismos agresores y células infectadas por virus o células tumorales? Para explicarlo responderemos específicamente a las siguientes preguntas menores: qué son y para qué sirven los anticuerpos?; qué es y para qué sirve el complemento?; qué son y para qué sirven las interleuquinas? y cuáles son y para qué sirven las células citotóxicas?

5.1 Qué son y para qué sirven los anticuerpos

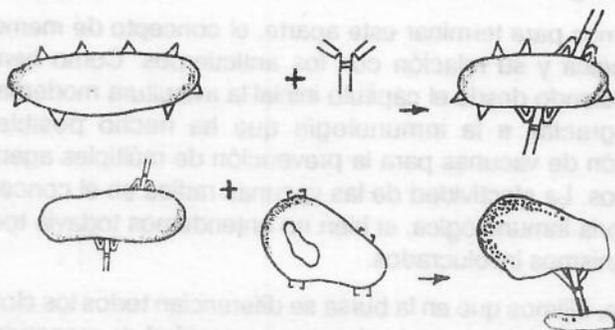
Los anticuerpos fueron la primera sustancia soluble caracterizada como efectora de la respuesta inmune (Behring y Kitasato 1890) y fueron el origen de la teoría de la inmunidad humoral, contraria a la teoría de la inmunidad celular, defendida por Metchnikoff y sus seguidores, descubridores y devotos de la fagocitosis. Los anticuerpos son glicoproteínas globulares producidas por los linfocitos B y constituidas por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas unidas entre sí por enlaces disulfuro. Los anticuerpos también se conocen como gammaglobulinas debido a sus propiedades de migración en un campo electroforético que las coloca más allá de las albúminas, las alfa globulinas y las beta globulinas; igualmente se utiliza con mucha frecuencia el término inmunoglobulina para referirnos a estas proteínas.

Las inmunoglobulinas (el plural lo utilizamos para indicar que existen varias clases como lo veremos más adelante) tiene forma de Y, con una región variable, pero siempre idéntica en cada uno de los extremos distales de los brazos y con una región constante hacia el extremo opuesto. La parte variable contiene los receptores específicos para el determinante antigénico respectivo que se conoce con el nombre de Fab (fracción que se une al antígeno), de tal suerte que una molécula de anticuerpo puede reaccionar simultáneamente con dos determinantes antigénicos (indéticos entre sí).

La pregunta que surge, entonces, es: qué efecto tiene la unión del anticuerpo al determinante antigénico? Pongamos en primer lugar el caso de un antígeno soluble como una toxina; si el anticuerpo se une a la fracción activa de la toxina ocurrirá una neutralización. Esa neutralización también se puede dar por la unión de anticuerpos en sitios cercanos al sitio activo de la toxina pues los anticuerpos así unidos podrían impedir el acercamiento de la toxina a su blanco respectivo. Otra efecto de la unión de anticuerpo a una toxina es la precipitación mediante la cual se unen múltiples moléculas de la toxina gracias a la unión de múltiples moléculas de anticuerpos formándose un agregado insoluble que es fácilmente fagocitado.

Si el antígeno problema es un virus, la unión del anticuerpo puede neutralizarlo, cuando el determinante antigénico es el receptor viral o un sitio cercano, tal como ocurre con las toxinas; igualmente los anticuerpos pueden agregar las partículas virales con lo cual se disminuye la posibilidad de que estas partículas infecten una célula y además se facilita la fagocitosis. Finalmente, cuando se trata de bacterias o parásitos flagelados, los anticuerpos, neutralizan sus toxinas, agregan las células, inmovilizan los flagelos, cubren sitios de adherencia y aún en parásitos con ciclos de reproducción sexual, se ha demostrado que los anticuerpos, en estos casos llamados "ablastinas" tienen la capacidad de interferir con la función reproductiva. En todos estos casos tenemos que tener en cuenta que se necesitan anticuerpos en suficiente cantidad relativa con relación a la concentración de la toxina o a la cantidad de microorganismos para que puedan ocurrir la neutralización, la precipitación, la aglutinación, etc.

Otras funciones efectoras de los anticuerpos son el producto de la interacción con otras proteínas como el complemento y de otras células como los fagocitos en general, los macrófagos en particular y las células NK. El papel del complemento, y de los macrófagos como células citotóxicas y de las células NK lo veremos más adelante. Ahora analicemos cómo los fagocitos en general (incluidos en esta categoría los heterófilos, y los macrófagos) coadyuvan con los anticuerpos para destruir una partícula indeseable. Se trata del fenómeno llamado opsonización que consiste en la fagocitosis más efectiva cuando la partícula está recubierta con anticuerpos que han reaccionado en forma específica con determinantes antigénicos en la superficie de la partícula a fagocitar. El mecanismo que explica esta facilitación de la fagocitosis está relacionada con el otro extremo de la molécula de anticuerpo; ya se dijo que los brazos de la molécula tienen la fracción que reacciona con el determinante antigénico; la cola, que podemos imaginar proyectándose hacia el exterior en la partícula atacada por los anticuerpos, y que constituye la parte constante de la molécula, tiene características que le confieren propiedades biológicas muy importantes a las diferentes clases de inmunoglobulinas. En el caso de la opsonización es la fracción Fc del anticuerpo (fracción cristalizante) para la cual existen receptores (RFc) sobre la superficie de los fagocitos los que facilitan la unión y la ingestión de la partícula. (Gráfico 1).



Mecanismo de opsonización a través de el fragmento Fc del anticuerpo y los receptores para el fragmento Fc en la célula fagocítica.

En la gallina, como se mencionó anteriormente, existen tres tipos de inmunoglobulinas: la IgM, la IgG y la IgA (en los mamíferos existen además la IgD y la IgE). La primera inmunoglobulina en hacer su aparición desde el punto de vista ontogénico es la IgM que puede detectarse en el citoplasma y en la superficie de los linfocitos B desde el día 12 de incubación; igualmente es la primera en aparecer en la respuesta inmune, pero no es la más abundante ya que muy pronto después del estímulo antigénico empieza a producirse IgG de la cual se logran más altas concentraciones que consecuentemente permanecen detectables por más tiempo en el plasma sanguíneo. La IgA por su parte se detecta posteriormente a la IgG y sus niveles son mayores a nivel de mucosas especialmente a nivel de bilis, fluido intestinal y secreciones respiratorias.

La IgG es la encargada de transmitir inmunidad pasiva a los pollitos, pues es la única que se encuentra en la yema y puede acumularse allí en concentraciones mayores que las existentes en el suero de la gallina; esta es también la inmunoglobulina que tiene una vida media más larga (alrededor de 20 días, mientras que las inmunoglobulinas M y A tienen una vida media de alrededor de 5 días) por lo tanto es un anticuerpo más apto para cumplir con esa función de transferencia pasiva de inmunidad a la progenie. En pavos y seguramente en otras especies que no se han estudiado al respecto, también se encuentra IgM e IgA en la clara del huevo, pero sin ninguna función aparente a nivel de transferencia pasiva.

Recordemos para terminar este aparte, el concepto de memoria inmunológica y su relación con los anticuerpos. Como hemos venido diciendo desde el capítulo inicial la avicultura moderna es posible gracias a la inmunología que ha hecho posible la producción de vacunas para la prevención de múltiples agentes infecciosos. La efectividad de las vacunas radica en el concepto de memoria inmunológica, si bien no entendemos todavía todos los mecanismos involucrados.

Pues bien, dijimos que en la bursa se diferencian todos los clones de linfocitos B del ave, cada clon con capacidad de responder a un determinante antigénico. Cuando finalmente el determinante antigénico hace contacto por primera vez con el ave, el clon de

linfocitos proliferan para dar lugar a células plasmáticas (productoras de anticuerpos) y a células de memoria. Estas células de memoria no se han caracterizado pero podría tratarse simplemente del clon original aumentado de tamaño debido al estímulo original; de todas maneras el resultado cierto es que al producirse un nuevo contacto con ese determinante antigénico se produce una respuesta secundaria, caracterizada por ser más rápida y por lograrse mayores niveles de anticuerpos en comparación con la primera ocasión. Podemos decir pues en términos muy sencillos que las vacunas lo que hacen es incrementar el clon de linfocitos contra un determinante (o grupo de determinantes) antigénicos de importancia, a fin de predisponer al ave a producir una respuesta inmune secundaria cuando el parásito virulento se presente en el galpón.

5.2 Qué es y para qué sirve el complemento

El complemento fue descubierto por Pfeiffer desde 1894 en relación con el fenómeno de lisis de bacterias in vitro, en presencia de suero inmune. El tratamiento de este suero con calor (56 grados C por 30 minutos) es capaz de abolir la acción lítica del suero, sin destruir los anticuerpos que aún después del tratamiento pueden transferir la inmunidad en forma pasiva; sin embargo, un suero no inmune no tenía la actividad lítica. Se trataba pues del efecto de los anticuerpos (termorresistentes) y otra sustancia (termosensible) a la cual se le dió el nombre de complemento.

En la actualidad sabemos que el complemento consiste de una serie de por lo menos 15 proteínas, que se encuentra en el suero normal de todos los vertebrados y cuyos genes se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad.

La acción final del complemento es lisar la células blanco mediante ataque a la membrana, lo que conduce a la formación de poros y a choque osmótico; sin embargo en el proceso de la fijación de complemento se produce otra serie de productos intermedios con potente actividad inflamatoria.

Para que se inicie la fijación de complemento se requiere la formación de complejos antígeno-anticuerpo, pero solo la IgG y la

IgM son activos en la fijación de complemento. Una vez que se ha unido una molécula de IgM a un antígeno (esta molécula es pentamérica) o cuando se han unido dos moléculas de IgG, una cercana a la otra, en un antígeno, se inicia la fijación del complemento que consiste en la unión al Fc de la molécula de anticuerpo, del complemento 1 (C1) que tiene tres fracciones C1q, C1r y C1s cada uno de los cuales se activa en forma secuencial. Al unirse la fracción C1s el complejo adquiere características de enzima proteolítica y actúa sobre el complemento 4. Este C4 se parte en dos subunidades una de las cuales se pega a la membrana sobre la cual se pegó el anticuerpo y la otra se adhiere al complejo que viene creciendo para actuar sobre el complemento 2 y una vez que este se ha unido, actúa sobre el complemento 3 (igualmente por acción enzimática).

La acción enzimática del paso anterior es capaz de actuar sobre miles de moléculas de C3. Cada una de estas moléculas de C3 se parte en C3a y C3b. El C3b se pega a la membrana que está siendo atacada y a otras membranas de células vecinas al sitio del ataque (bien glóbulos rojos, bacterias, macrófagos, trombocitos, etc, los cuales tienen receptores para el C3b) algunas de estas moléculas de C3b también se unen al complejo creciente del complemento para activar por acción enzimática el C5. El C3a, permanece en la fase fluida y tiene potente acción flogística como lo veremos más adelante.

El C5 se parte también en dos pedazos uno pequeño, el C5a, y el C5b. Este último activa el complemento 6 y 7 los cuales activan la acción de C8 y C9 que es la de hacer poros sobre la membrana de la célula atacada.

Para entender la importancia de la fijación de complemento debemos recordar que el C4 fue capaz de actuar sobre miles de moléculas de C3, lo cual amplifica la reacción. Igualmente recordemos que al ir actuando los diferentes componentes, parte de ellos se quedó pegada a la membrana o en la fase fluida. Los primeros cumplen una función llamada de adherencia inmune, mediante la cual las partículas a las cuales se han adherido estas sustancias se pegan fácilmente a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y otras superficies haciendo a la partícula presa

fácil de células fagocíticas. El componente de complemento más activo a este respecto es el C3b.

El C3a, el C5a y parcialmente el C5a cumplen una potente acción anafilotóxica, lo cual quiere decir que inducen inflamación mediante degranulación de basófilos y aumentando los niveles de histamina en el sitio, con lo cual aumenta la permeabilidad capilar, ocurre extravasación de líquidos (con anticuerpos incluidos) y el consecuente edema. Igualmente el C5a y el C3a son potentes agentes quimiotácticos, con lo que se logra atraer al sitio una gran cantidad de células efectoras que siguen "alimentando" el proceso inflamatorio. Finalmente, aunque no menos importante, debemos mencionar que el C4b también tiene acción de opsonina, que como lo mencionamos antes significa que este compuesto facilita la fagocitosis.

Además de la forma o vía clásica de activación del complemento que acabamos de anamizar, existe una vía llamada alterna, que no requiere la reacción de antígeno y anticuerpo. Esta vía es mucho más vieja filogenéticamente que la vía clásica y su iniciación ocurre por sustancias como las endotoxinas, el lipopolisacárido, paredes celulares de algunas bacterias, levaduras y por inmunoglobulinas agregadas (inclusive de la clase IgA). Esta vía alterna ignora los pasos entre C1 y C4, activando directamente al C3. El estímulo se une al C3b que normalmente está en la circulación en pequeñas cantidades, y luego se une al factor B y al factor D; este complejo actúa ahora sobre el C3 que libera C3a y C3b y a partir de este momento la reacción continúa como por la vía clásica. Estas dos vías no son antagónicas pues aparentemente la vía alterna se puede utilizar también como factor de amplificación cuando la reacción se inicia por la vía clásica.

Finalmente digamos que las proteínas del complemento y la reacción en general deben estar muy estrechamente reguladas, dada su potente acción biológica y el riesgo de reacciones deletéreas para el huésped. En primer lugar debemos decir que la vida media de las diferentes fracciones activadas del complemento es muy corta; este sería quizá el más potente factor regulador. Pero también existen inhibidores específicos como el de la C1 esterasa, el del C3b, del C4b y de la anafilotoxina. A nivel de la vía alterna

por su parte, existen el estabilizador del complejo C3bBb y el inhibidor del C3b, de los cuales se han caracterizado dos: el factor H y el factor I.

El complemento es pues una plétora de proteínas, producidas como pro-factores por el hígado (principalmente por macrófagos), por monocitos circulantes y por células epiteliales del intestino.

5.3 Qué son y para qué sirven las citoquinas

Bien, acabamos de ver que las inmunoglobulinas son el producto específico efector de los linfocitos B, o sea de la respuesta humoral. Para el caso de la respuesta inmune celular, vale decir, aquella que no es transferible con suero, sino con células y básicamente con linfocitos T, podríamos decir, haciendo una comparación muy libertina, que las citoquinas son la contraparte de los anticuerpos, en el sentido de que ellas son el producto soluble que las células T estimuladas producen y excretan. Pero los efectos de las citoquinas son diferentes.

Recordemos que las células presentadoras de antígeno, al ponerse en contacto con el linfocito T correspondiente, es decir, aquel que es capaz de reaccionar específicamente con el determinante antigénico presente en la superficie de la célula presentadora (un macrófago, por ejemplo) y a través (o por medio de) los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (clase II o B-L de la gallina como vimos anteriormente) produce interleuquina-1 (il-1) antes llamada factor activador de los linfocitos, y que tiene capacidad de actuar sobre muchas células; pero principalmente sobre el linfocito T ayudador. La il-1 es una de las principales sustancias mediadoras de la fiebre y de la respuesta inflamatoria en general (la il-1 es pues el equivalente del famoso pirógeno endógeno "conocido" de vieja data.

La función principal de la il-1 sobre el linfocito T es coestimular (conjuntamente con el determinante antigénico) a dicho linfocito, para que este a su turno, produzca receptores de alta afinidad para la interleuquina-2 y luego produzca la interleuquina-2 (il-2) que es la segunda citoquina que entra en acción. La il-2 es una glicoproteína de bajo peso molecular (9-11 kD en la gallina) con

efecto autocrino sobre el linfocito T, al cual se adhiere a través de los receptores respectivos ya expresados en la membrana.

La il-2 estimula al linfocito T para proliferar (antes esta citoquina se llamaba factor de crecimiento de los linfocitos T). Si teóricamente, o también en la práctica in vitro, se logran mantener los niveles de il-2, los linfocitos preactivados por la il-1 y el antígeno seguirán proliferando indefinidamente, por lo menos hasta cuando los nutrientes se agoten. Este es el principio de la tecnología de los clones de linfocitos T, que son la contraparte de los anticuerpos monoclonales y que han revolucionado el mundo de la inmunidad celular.

Posteriormente, en el proceso de la respuesta inmune, entra en acción una citoquina conocida desde hace muchos años, pero perteneciente, en un principio, solo al reino de los virólogos; se trata del interferón (IFN). El IFN o interferones, porque ya se han caracterizado varios (alfa, beta y gamma), se caracterizan por tener actividad antiviral; pero el IFN gamma se caracteriza además, por ser producido por linfocitos T en el proceso de una respuesta inmune. Por esta misma razón se le da también el nombre de IFN inmune a esta citoquina. Los efectos del IFN son múltiples y sobre muchas células, pero quizás el efecto mayor en relación con la defensa inmune sea la activación de macrófagos y de células NK, como veremos en el próximo aparte.

Estas son las tres citoquinas presentes hasta el momento en las aves; en mamíferos se conoce de la presencia de muchas otras citoquinas como las interleuquinas 3, 4, 5, 6, 7, y 8 (por ahora). Seguramente en un futuro próximo los equivalentes de estas citoquinas de los mamíferos se descubrirán también en las aves.

Hemos hablado de citoquinas, interleuquinas y se habla también de monoquinas y linfoquinas. Para tratar de evitar toda la confusión que estos nombres han introducido, recientemente se propuso que se use el término genérico citoquina para todos estos factores, si todavía no están bien caracterizados, y se reserve el término interleuquina para aquellas cuyas características funcionales, bioquímicas y genéticas estén bien establecidas; como en el caso de la il-1, la il2 y el IFN gamma.

Para terminar resumiendo, definamos citoquinas como sustancias de origen glicoproteico, de bajo peso molecular, producidas por células monocíticas o linfocíticas y que en forma exocrina o autocrina pueden ejercer múltiples acciones sobre muchos tipos de células, pero principalmente sobre el sistema inmune y la médula ósea. Las citoquinas modifican el comportamiento de las células en forma dramática y parte de esos efectos es el tema de la próxima sección.

5.4 Qué son y para qué sirven las células citotóxicas

En apartes anteriores hemos visto que los linfocitos T son importantes para ayudar en la respuesta humoral; pero, tiene el linfocito T *per se*, algún efecto contra un agente invasor o contra una célula tumoral? La respuesta es positiva; tal es la función del linfocito T citotóxico que en mamíferos también se conoce como linfocito CD8+ y en la gallina como linfocito CTLA 3+4+.

Veamos algunos detalles de este tipo de citotoxicidad. Ya hemos visto que el procesamiento del antígeno y su presentación conducen a la activación de un linfocito T ayudador. Este linfocito colabora con la célula B para la producción de anticuerpos y con el linfocito T CD8+ para la respuesta citotóxica. Bajo el efecto de la il-2 producida por el ayudador también proliferan los linfocitos citotóxicos.

El linfocito T citotóxico está diseñado para, en una forma muy eficiente, destruir células del mismo individuo (o de otro parecido o idéntico desde el punto de vista de la histocompatibilidad), que se encuentre infectada por un virus o cualquier otro parásito intracelular, o que se encuentre transformada por un proceso tumoral. Esto equivale a decir que la citotoxicidad mediada por los linfocitos T es específica (solo contra una célula anormal determinada) y está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (por antígenos de clase I, o sea los del grupo B-F de la gallina).

Pero el linfocito T no es la única célula citotóxica; también pueden ser citotóxicos los macrófagos activados y las células NK. De los macrófagos vamos a hablar a profundidad en el último capítulo; de las células NK digamos que se trata de células linfoides que no

son ni T ni B y tiene una función citotóxica natural, es decir, sin que el individuo se haya puesto en contacto previamente con el antígeno correspondiente (Natural killers). Estas células serían la primera barrera contra los tumores (efectoras de la vigilancia inmune) y en las gallinas se las ha asociado específicamente con una mayor resistencia a la enfermedad de Marek.

Tanto los macrófagos como las células NK son estimuladas por el IFN-gama para ejercer el efecto citotóxico; lo que significa que esta función citotóxica es un efecto indirecto de los linfocitos T que son los principales productores del IFN inmune.

El mecanismo citotóxico de los linfocitos T y de las células NK es similar: ambas células se acercan al blanco, reconocen el daño y luego depositan perforinas sobre la superficie de la célula anormal. Esa perforina es una proteína que se encuentra preformada en los gránulos de las células citotóxicas y actúa en forma parecida al complemento, es decir se polimerizan las moléculas de perforina formando cilindros que a manera de agujas hipodérmicas se introducen en las membranas de las células, permitiendo el ingreso de líquidos y consecuentemente la lisis.

Los mecanismos líticos de los macrófagos no se conocen a cabalidad pero se sabe que, bajo el efecto del IFN-gama estas células se activan; lo cual quiere decir que adquieren mayor capacidad fagocítica y bactericida, asociada con un aumento de la actividad lisosomal y del metabolismo, con la consecuente producción de metabolitos del oxígeno (oxígeno simple, radicales hidroxilo y el peróxido del hidrógeno que, por sí mismos, o en combinación con halógenos como el cloro y el flúor son altamente tóxicos).

Otro mecanismo muy importante de citotoxicidad, que ya habíamos mencionado anteriormente en forma tangencial, es el relacionado con la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Se trata, como su nombre lo indica, de una situación donde un anticuerpo ha reaccionado con su determinante antigénico sobre una célula (digamos un antígeno viral sobre una célula infectada); luego cualquier célula que tenga receptores para el Fc (es decir la cola del anticuerpo) puede unirse y proceder a destruir la célula infectada. El anticuerpo sirve, pues, como indicador y puente entre

la célula infectada y la célula efectora. Las células con receptores Fc, capaces de ejercer esta acción citotóxica son los monocitos/macrófagos, las células NK y por lo menos en mamíferos, algunos granulocitos.

En resumen, podemos decir que las células citotóxicas de la gallina son los linfocitos CTLA 3+4, los macrófagos activados y las células NK. Los linfocitos T son específicos y están restringidos por los antígenos B-F; mientras que las células NK son inespecíficas (pero solo atacan células anormales) y no están restringidas por histocompatibilidad.

5.5 Resumen: La inducción y la acción de la respuesta inmune

Intentemos ahora un resumen que reúna la información hasta ahora presentada y nos sirva de introducción al próximo capítulo. Una molécula antigénica tiene múltiples determinantes antigénicos que al ser procesados y presentados por una célula presentadora apropiada (es decir que sea autóloga; o que sea singénica, como de un hermano gemelo; o que sea haploidéntica, como de un hermano no idéntico con quien se comparten antígenos de histocompatibilidad a nivel del locus B-L) son capaces de estimular a los linfocitos T ayudadores, a los linfocitos T citotóxicos y a los linfocitos B que se han diferenciado a nivel del timo y de la bursa respectivamente y que permanecen en circulación y a nivel de los órganos linfoides periféricos a la espera de su determinante antigénico.

Este encuentro del determinante antigénico y el linfocito da lugar a linfoproliferación y a la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B y de citoquinas y células T citotóxicas por parte de los linfocitos T.

A nivel de las mucosas existen mecanismos que aseguran una distribución de IgA y de células plasmáticas productoras de IgA dirigida contra antígenos que han penetrado por esta vía, a lo largo y ancho de todas las mucosas del organismo. Estos factores, más la presencia de otros factores como linfocitos T, macrófagos, heterófilos, eosinófilos y basófilos; todos ellos representados en las mucosas, principalmente en el momento de la inflamación, garantizan la defensa a este nivel.

Los anticuerpos IgM, e IgA, tienen la función de reaccionar con el determinante antigénico respectivo en la molécula antigénica y así neutralizar su acción, como cuando se trata de una toxina; o impedir su replicación como en el caso de los virus; u opsonizar la partícula antigénica para facilitar su fagocitosis; o servir de puente para mediar la citotoxicidad mediada por anticuerpos por parte de monocitos/macrófagos, o de células NK.

La IgM y la IgG, por su parte, al reaccionar con la partícula o molécula que contenga el determinante antigénico, activa el complemento que es una serie de proteínas que actúan a manera de detergente destruyendo las membranas celulares y conduciendo al choque osmótico de las células blanco, llámese una célula infectada, una célula transformada o una bacteria.

Los linfocitos T activados, al contacto con su determinante antigénico producen citoquinas que ejercen múltiples acciones sobre diferentes células del organismo, principalmente sobre células leucocíticas y sobre la médula ósea. Entre estas se han caracterizado en las aves, la Interleuquina 1, la Interleuquina 2 y el interferon gamma. Adicionalmente, los linfocitos T citotóxicos son capaces de destruir una célula infectada o transformada al descubrir el determinante antigénico respectivo; pero aquí debemos recordar la restricción genética; es decir, que la célula blanco además del determinante antigénico, también debe expresar antígenos de clase I (o sea B-F) del mismo huésped. Esta lisis se lleva a cabo mediante la degranulación del linfocito T que conduce a la excreción de perforinas que actúan en forma similar al complemento para destruir la célula blanco.

Existen otras células que pueden ejercer funciones citotóxicas como los macrófagos y las células NK; estas a diferencia de los linfocitos T citotóxicos no están restringidos genéticamente y solo requieren la activación por parte del interferon gamma para cumplir esta función. (ya mencionamos anteriormente que también puede haber citotoxicidad mediada por anticuerpos y también son los monocitos/macrófagos y las células NK los encargados de la lisis en este caso).

En ningún momento debemos olvidar que la respuesta inmune necesita mecanismos reguladores y que si bien, los linfocitos T

supresores han perdido popularidad, el efecto regulador todavía está presente; los anticuerpos anti-idiotípicos y los macrófagos podrían ser los principales actores en este caso.

La respuesta inmune total es pues, el resultado de múltiples respuestas dirigida cada una contra un determinante antigénico distinto. Quizá para la defensa efectiva del huésped no sean necesarias todas esas respuestas ya que posiblemente no todos los determinantes antigénicos son relevantes. También hay pie para pensar que eventualmente algunas de estas respuestas sean nocivas para la defensa efectiva del huésped, bien porque interfieran con otra respuesta que sí sea necesaria (a nivel de la inducción de la respuesta o a nivel efector) o bien porque esa respuesta superflua para la defensa evoque unos mecanismos reguladores-supresores tan potentes, que toda la respuesta se vea suprimida. Adicionalmente, esa respuesta innecesaria para la defensa del huésped podría ser útil para la sobrevivencia del parásito coadyuvando con el mantenimiento de la infección o, finalmente, podría ser que esa respuesta innecesaria para la defensa sea nociva para el huésped contribuyendo, por mecanismos inmunopatógenos, a causar la enfermedad respectiva (este sería el caso de la enfermedad de moda en Colombia, el Dengue hemorrágico).

Pues bien, si fuésemos capaces de producir el determinante antígeno que es capaz de inducir una respuesta protectora y si lográramos además presentárselo al ave en una forma apropiada para que los macrófagos entren a cumplir su función presentadora al linfocito T y se desarrolle la respuesta normal, nos ahorraríamos todas las demás respuestas innecesarias y potencialmente nocivas.

Al logro del objetivo anterior se encuentran encaminados buena parte de los esfuerzos de los inmunólogos en la actualidad. La biología molecular abrió la posibilidad de la ingeniería genética y de la síntesis química, y la inmunología ha explorado adicionalmente la posibilidad de lograr vacunas "inteligentes" con la novedosa idea de los anticuerpos antidiotípicos: se trata, brevemente, de que cuando un determinante antigénico induce una respuesta de anticuerpos, el organismo trata de controlar esa

respuesta produciendo un anti-anticuerpo; este anticuerpo 2 esta dirigido contra aquella parte de la molécula que reconoce y reacciona con el determinante antigénico original. Podemos inferir entonces que el anticuerpo 2 y el determinante antigénico deben ser muy parecidos molecularmente, cuando son capaces de reaccionar específicamente con el mismo anticuerpo 1. Al anticuerpo 2 se le conoce como anticuerpo antidiotípico y efectivamente se ha encontrado que inoculando este tipo de anticuerpos en un huésped, se logra estimular una respuesta de anticuerpo 1 protector, tal como si se hubiera inoculado el determinante antigénico correspondiente. Veamos, en el capítulo siguiente, el modelo de la *Eimeria tenella* donde se han logrado grandes avances en la moderna inmunología aviar.

Gracias a estos avances en la moderna tecnología exist
siguiente el modelo de la Cámara donde se han logrado
determinar algunas características. Véase en el capítulo
antecedente 1 protector, tal como se ha indicado en
antecedentes en un capítulo, se logra eliminar una respuesta de
electrónica se ha encontrado que involucra este tipo de
antecedentes 2 se le conoce como antipropagación y
reaccionar específicamente con el mismo antipropagación 1. Al
ser muy parecido tecnológicamente, cuando son capaces de
entonces que el antipropagación 2 y el determinante electrónico deben
reaccionar con el determinante electrónico original. Podemos indicar
debido a que existe parte de la molécula que reacciona y
esta se produce en un antipropagación, este antipropagación 2 esta

6. LA EIMERIA TENELLA: UN MODELO DE INVESTIGACION INMUNOLOGICA

Las coccidias representan un modelo del tipo de parásito que a través de su ciclo biológico tienen diferentes estadios (esporozoito, merozoito, esquizonte) y con cada estadio expresan diferentes determinantes antigénicos. Esto lógicamente representa un mayor nivel de complejidad para el sistema inmune.

Las aves producen una buena respuesta de anticuerpos muy pronto después del contacto con la coccidia, logrando un máximo en dos semanas, lo cual es seguido por un descenso de esos niveles. La importancia de los anticuerpos contra estos parásitos es discutible pues no hay correlación entre los altos títulos de anticuerpos y la protección. Si se inoculan coccidias muertas en un ave se producen altos títulos de anticuerpos detectables por diferentes técnicas, pero tales anticuerpos no protegen contra una reinoculación oral de parásitos virulentos. Estudios realizados en aves bursectomizadas han demostrado que el papel de los anticuerpos no es tan crucial, pues si bien la infección primaria es más severa en estas aves, finalmente se logra una inmunidad sólida. Sin embargo el hecho de que sí exista alguna protección pasiva en pollitos recién nacidos es una prueba de que los anticuerpos sí juegan un papel protector.

La IgA parece ser la principal inmunoglobina protectora contra las coccidias y ello debido a la localización de este anticuerpo a nivel intestinal, particularmente en bilis, en el contenido intestinal, en las

amígdalas cecales y en el ciego. Los anticuerpos, aparentemente, inhiben la penetración de los esporozoitos a las células.

Pues bien si los anticuerpos no son tan importantes, el papel principal en este caso lo tendrán los linfocitos T. En efecto, una respuesta de inmunidad celular contra coccidias se puede demostrar mediante pruebas de linfoproliferación, de hipersensibilidad retardada y pruebas de activación de macrófagos.

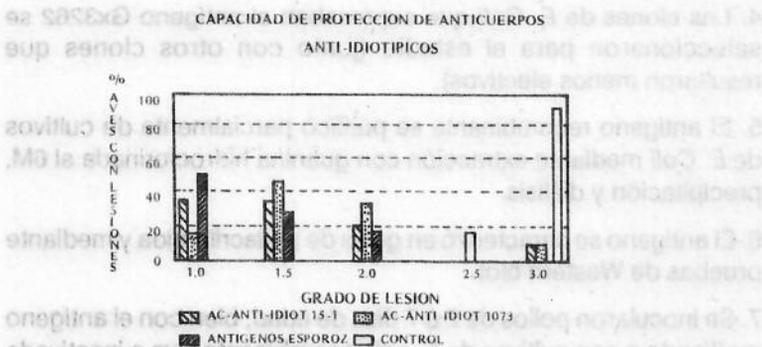
A diferencia de la respuesta de anticuerpos, la hipersensibilidad retardada aparece más tardíamente pero se mantiene a largo plazo y se correlaciona positivamente con la resistencia. Una de las características sobresalientes de la inmunidad contra las coccidias es el aumento de linfocitos a nivel de la mucosa intestinal, lo que conduce a una linfopenia transitoria a nivel periférico, principalmente a expensas de los linfocitos T.

Los macrófagos de las aves inmunizadas fagocitan más activamente los esporozoitos que los de las aves no inmunes; ello parece deberse a la opsonización por los anticuerpos. Sin embargo, los esporozoitos fagocitados pueden sobrevivir la fagocitosis de tal suerte que los macrófagos y los anticuerpos podrían ser mejores aliados del parásito que del huésped!

Otras células que se movilizan ante la infección con coccidias son los heterófilos (que son la contraparte de los neutrófilos de los mamíferos); estas células también se concentran en la mucosa intestinal, especialmente si el ave está inmunizada. Los mastocitos de la mucosa intestinal también podrían coadyuvar en la respuesta contra la coccidia, degranulando y aumentando la permeabilidad capilar para facilitar la movilización de anticuerpos y células efectoras; pero la respuesta de estas células no es muy conspicua. Estas son generalidades sobre la respuesta a las coccidias, según información obtenida con diferentes especies del parásito: *tenella*, *mivati*, *dispersa*, *necatix*, *brunetti*, *acervulina* y *maxima*. Tomemos ahora el caso específico de la *Eimeria tenella*.

Sería posible diseñar anticuerpos anti-idiotípicos para la protección contra la *E. tenella*? Bhogal y colaboradores en 1988 nos dieron una respuesta positiva. Veamos la evidencia:

1. Se produjeron anticuerpos monoclonales contra esporozoitos del parásito.
2. Se seleccionaron dos de estos monoclonales que tenían capacidad de inducir protección pasiva contra la infección en gallinas.
3. Los anticuerpos monoclonales (que son el anticuerpo 1) se inocularon en conejos para que estos produjeran anti-anticuerpos (o sea el anticuerpo 2).
4. Del suero de los conejos se obtuvieron, efectivamente los anticuerpos anti-Idiotípicos, demostrados por pruebas serológicas de competencia).
5. Los anticuerpos anti-Idiotípicos (producidos en el conejo) se inocularon en aves jóvenes (días 4, 18 y 30 de edad) y dos semanas después de la última inoculación se infectaron con el parásito virulento. Seis días postinoculación se evaluaron las lesiones.
6. Los resultados fueron los siguientes (según adaptación de Bhogal y Cols. *Infection and Immunity* 56 (5), 1988).



Adaptada de Bhogal y Cols.
Infect. Immunity 56(6) 1989.

FIG. 1

De la figura 1 se desprende que los anticuerpos anti-Idiotípicos 15-1 y 1073 inducen anticuerpos protectores comparables a los inducidos por el antígeno de esporozoitos; la protección es parcial, pero las lesiones que se producen son menos severas.

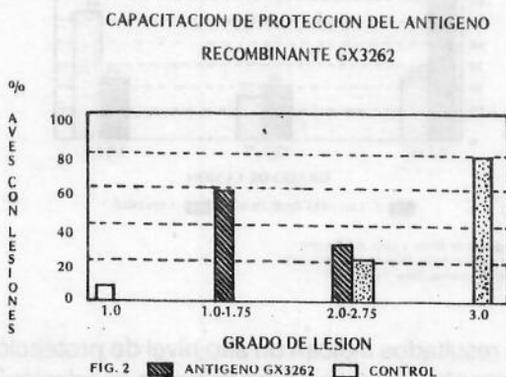
Lo que es más interesante es el hecho que el papel protector de los anticuerpos anti-idiotípicos no es solamente a nivel de la inmunidad humoral; en este mismo trabajo se demostró que el anticuerpo 1073 también es capaz de estimular una respuesta de inmunidad celular y ello es compatible con resultados obtenidos en otros modelos y en otras especies.

Será posible la producción de una vacuna recombinante eficiente, contra la *E. Tenella*? El mismo grupo de Bhogal, ahora encabezado por Miller y Cols, dieron una respuesta a este interrogante en la Reunión del Grupo de Investigación en Inmunología Aviar, en Holanda, 1988. A continuación se hace un corto resumen del protocolo y de los resultados.

1. Se seleccionó el antígeno Gx3262 para el estudio.
2. El gene que codifica para este antígeno se identificó de una genoteca de DNA complementario obtenida a partir de RNA mensajero de oocistes de *E. Tenella*.
3. E. DNA complementario se clonó en *Escherichia coli* utilizando el fago Lamda gt11 como vector.
4. Los clones de *E. Coli* que expresaban el antígeno Gx3262 se seleccionaron para el estudio (junto con otros clones que resultaron menos efectivos).
5. El antígeno recombinante se purificó parcialmente de cultivos de *E. Coli* mediante extracción con guanina hidrociorinada al 6M, precipitación y diálisis.
6. El antígeno se caracterizó en geles de poli-acrilamida y mediante pruebas de Western blot.
7. Se inocularon pollos de 2 ó 7 días de edad, bien con el antígeno purificado o con cultivos de *E. coli* recombinante viva o inactivada (con calor o con formalina).

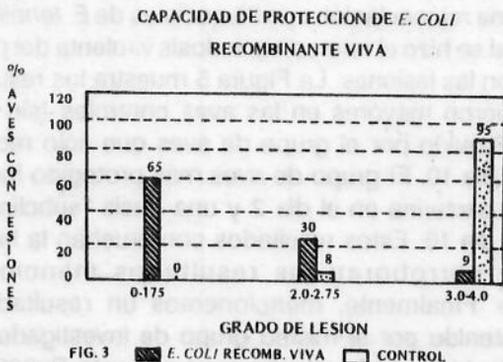
Los resultados demuestran que 3 inoculaciones a intervalos de una semana, con el antígeno Gx3262 inducen un alto nivel de inmunidad contra una infección experimental de *E. Tenella*. Sólo se observaron lesiones menores o moderadas a nivel del ciego.

Las siguientes gráficas son adaptaciones de Miller y Cols, "Recent advances in avian Immunology research", Allan R Liss Inc. New York, 1989. (Figuras 2, 3 y 4).



Adaptada de Miller y Cols. En: Recent Advances in Avian Immunology Research Allan R Liss Inc. New York 1989.

La figura 2 indica el efecto del antígeno Gx3262 en comparación con su respectivo control. La Figura 3 demuestra el efecto del antígeno recombinante administrado en la *E. coli* viva y la Figura 4 es el resultado de la *E. coli* recombinante inactivada con calor (bacterina).



Adaptada de Miller y Cols. En: Recent Advances in Avian Immunology Research Allan R Liss Inc. New York 1989.

CAPACIDAD DE PROTECCION DE *E. COLI*
RECOMBINANTE INACTIVADA CON CALOR

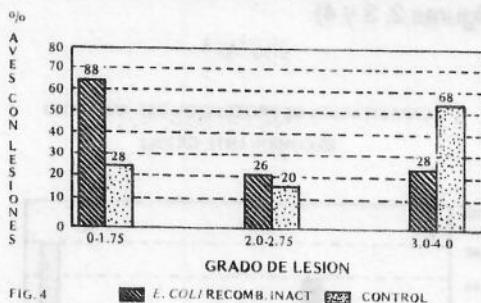


FIG. 4

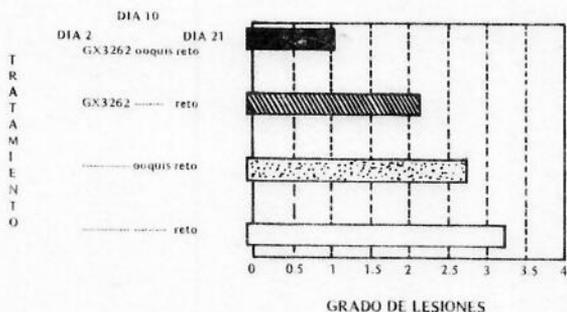
■ E. COLI RECOMB. INACT ▨ CONTROL

Adaptada de Miller y Cols. En: Recent Advances in Avian Immunology Research Allan R Lise Inc. New York 1989.

En general los resultados indican un alto nivel de protección pues en todos los casos las lesiones fueron mínimas en relación con los controles.

Ahora el grupo de investigadores procedió a probar la hipótesis que las aves parcialmente protegidas con los esquemas vacunales descritos y expuestas a dosis bajas de oocistos (infección "subclínica" como ocurre en el campo), producen una respuesta anamnésica protectora. Para el efecto se inocularon las aves a los dos días de edad con la bacterina recombinante y a los 10 días de edad se hizo una reinoculación con 25 oocistos de *E. tenella*. A los 21 días de edad se hizo el reto con una dosis virulenta del parásito y se observaron las lesiones. La Figura 5 muestra los resultados: las lesiones fueron mayores en las aves controles (sin ningún tratamiento), seguido por el grupo de aves que sólo recibió 25 oocistos en el día 10. El grupo de aves más protegido fue aquel que recibió la bacterina en el día 2 y una dosis "subclínica" de oocistos en el día 10. Estos resultados comprueban la hipótesis formulada y corroboran los resultados mencionados anteriormente. Finalmente, mencionemos un resultado muy importante obtenido por el mismo grupo de investigadores. La inmunidad inducida por el antígeno recombinante Gx3262 tiene efectividad cruzada contra *E. acervulina*. Este efecto fue superior cuando se probó la *E. coli* viva que cuando se utilizó la bacterina.

EFEECTO VACUNACION CON GX3262 Y DOSIS
"SUBCLINICA" DE OOQUISTES



Adaptada de Miller y Cois. En: Recent Advances in Avian Immunology Research Allan R. Lise Inc. New York 1989.

FIG. 5

Estos son los hechos de hoy. Si bien la solución no está todavía en los anaqueles de las droguerías y aún si toda esta información tuviera que reevaluarse, lo cierto es que hemos avanzado y por lo tanto para el futuro no podemos esperar sino algo mejor; esta es la esperanza para el beneficio de la humanidad y a la vez el reto para el inmunólogo veterinario.

7. CULTIVO Y CARACTERIZACION DE MONOCITOS/MACROFAGOS DE PAVO

Resumen

Se describe un sistema para establecer y mantener monocitos/macrófagos de sangre periférica de pavo. El cultivo se inicia con mononucleares obtenidos mediante centrifugación en ficol-hipaque y cultivados en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. El mantenimiento del cultivo se basa en el reemplazo de 50% del medio usado por medio por medio fresco cada tercer día. Las células pueden mantenerse hasta por 40 días. Con base en la morfología, (observada al microscopio de luz y al microscopio electrónico de barrido), por su resistencia a la tripsinización, su capacidad fagocítica, su comportamiento en presencia de carageenan, su patrón de tinción con naranja de acridina, y esterases no específicas, la ausencia de tinción con diamina férrica y la presencia de receptores Fc, las células se clasificaron como monocitos/macrófagos.

Cultivos similares pudieron ser obtenidos igualmente a partir de la población adherente de leucocitos periféricos o del bazo, separados a través de columnas de nylon; este procedimiento sinembargo, no mejoró sino que redujo la longevidad de los cultivos.

Trabajo original del autor en: The viruses of hemorrhagic enteritis and marble spleen disease. Tesis de doctorado, Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia. 1983. pp. 77-102.

Introducción

La importancia de los macrófagos en el sistema inmune se ha reconocido desde hace muchos años (26) y el rango de funciones asignadas a estas células ha crecido y seguirá creciendo a medida que nuevas tecnologías faciliten su estudio. En la actualidad los macrófagos parecen ser las células más versátiles del sistema inmune y juegan roles preponderantes tanto en la fase aferente como en la fase efectora de la respuesta inmune y simultáneamente cumplen funciones reguladoras (6, 9, 14, 15, 23, 27, 28, 30, 36, 40, 42). Existe una larga lista de factores, mediadores y receptores de membrana que se han asociado con los mecanismos de acción del macrófago; metabolitos del ácido araquidónico, como las prostaglandinas y los leucotrienos se han propuestos como los factores mediadores de la modulación inducida por el macrófago (6). Estas células también producen y secretan enzimas hidrolíticas, peróxido de hidrógeno, radicales hidróxilo, radicales superóxido y nucleótidos cíclicos (2.1.20); también producen componentes del complemento, interferon, factor activador de linfocitos y eosinófilos (8, 9, 11, 10, 21). Los macrófagos, además expresan antígenos Ia, receptores Fc y C3 (3, 44, 48). Más recientemente se ha indicado la existencia de subpoblaciones de macrófagos, lo cual podría explicar en parte, la versatilidad de estas células (3, 13, 18, 24, 31, 32, 35, 47).

Uno de los problemas en el estudio de los macrófagos ha sido la dificultad para establecer cultivos puros, funcionalmente activos y cultivables a largo plazo *in vitro* (12, 33). En mamíferos, la cavidad peritoneal, los pulmones y la glándula mamaria son fuentes fáciles de macrófagos diferenciados, pero este no es el caso en especies aviares (16). El cultivo de mononucleares periféricos de gallina ha sido utilizado desde el principio del siglo (8) y la diferenciación de los mismos en células multinucleadas, células epitelioides y en macrófagos, ha sido demostrada ultraestructuralmente (41). Igualmente se han descrito receptores de superficie y el potencial fagocítico de células periféricas de la gallina (17).

El uso de sangre periférica como fuente de monocito/macrófagos tiene varias ventajas: primero, sería posible encontrar todo el

espectro de actividades y peculiaridades del macrófago en este sitio, puesto que los monocitos "circulantes" parecen ser un ancestro común de todos los macrófagos diferenciados (45); segundo, porque los monocitos dan la oportunidad de estudiar la cinética del crecimiento y diferenciación y tercero, porque el uso de las mismas aves donadoras permite el estudio del comportamiento de estas células a medida que el ave crece y en paralelo con manipulaciones experimentales de diferentes orden.

Este estudio es un esfuerzo por desarrollar técnicas permitan la evaluación in vitro de los efectos de los inmunopotenciadores como el *Propionibacterium acnes*, y de agentes reticuloendoteliotrópicos como el virus de la enteritis hemorrágica (VEH).

Materiales y métodos

Aves. Se utilizaron pavos Nicolas de cuatro a doce semanas de edad, mantenidos en semiaislamiento en las instalaciones del Centro de investigaciones de la Fac. de Medicina Veterinaria del Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia.

Separación y cultivo de las células. Se tomó sangre de la vena alar en tubos heparinizados, la sangre se mezcló con un volumen igual de solución de Hank y luego se sometió a centrifugación a 400 g durante 28 minutos a 15 grados C. Los mononucleares fueron colectados de la interfase y lavados tres veces con solución de Hank. Las células fueron resuspendidas en medio de crecimiento (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, penicilina y estreptomycin, glutamina y Hepes 1 M) a una concentración de 3 millones células viables por ml. Después de tres días de incubación a 37 grados C en incubadora, húmeda y con CO₂, las células se lavaron en su mismo medio utilizando pipeta Pasteur y el medio con las células no adherentes fue removido y centrifugado para devolver 50% del volumen del sobrenadante a las células adherentes; la alimentación se completó con 50% de medio de crecimiento fresco. Después de esta primera manipulación del cultivo, cada tres días se reemplazó 50% del medio por un volumen similar de nuevo medio.

Microscopía de luz y electrónica. Los cultivos de células vivas se observaron al microscopio invertido con contraste de fase. Células fijadas, teñidas con dif quick (Harleco), May grunwald giemsa, toluidina, cristal violeta o hematoxilina-eosina, fueron analizadas al microscopio de luz. Para la observación al microscopio electrónico las células se cultivaron sobre laminillas de vidrio, se fijaron 2.5% de gluteraldehído en solución de Sorensen por dos horas, se lavaron con la misma solución y se fijaron de nuevo con 1% de tretraóxido de osmio en cacodilato de sodio al 0.1 M. Luego las células se deshidrataron en alcoholes y se secaron al punto crítico con CO₂ (secador Ladd). Los especímenes se montaron en las rejillas, se cubrieron con un baño de oro y finalmente se analizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JMSZ 35C a 25 Kv.

Fagocitosis. Se utilizaron partículas de látex, levaduras opsonizadas o no opsonizadas, zimosán, glóbulos rojos de oveja y *Moraxela bovis*. Las células fagocíticas fueron evaluadas a diferentes tiempos post-iniciación del cultivo; se incubaron por 30 minutos a una hora con la partícula a fagocitar y luego se tiñeron con giemsa o dif quick para hacer la evaluación microscópica.

Receptores Fc. La presencia de receptores Fc se estudió mediante la técnica de formación de rosetas descrita por Kwan y cols. (22). En resumen la técnica consiste en el tratamiento de glóbulos rojos de oveja con dosis subaglutinantes de anticuerpos contra glóbulos rojos, producidos en pavos y agregados a los monocito/macrófagos por un período de 30 minutos a 37 grados C. El cultivo fue lavado y teñido con cristal violeta y las rosetas se observaron al microscopio de luz.

Tinción con esterases no específicas y con diamina férrica. Se utilizó alfa naftil acetato para demostrar esterasa no específicas según el procedimiento descrito por Li y cols. (25). La diamina férrica se utilizó según lo reportado por Spicer y cols. (37), para descartar la presencia de mastocitos.

Tinción con naranja de acridina. Este colorante tiene afinidad por lisosomas (21) y se utilizó para identificar monocito/macrófagos. Se utilizó una dilución de 0.25 g del colorante en 10 cc de solución de Hank y de esta se agregaron 20 ul a los pozos (de platos de 24

con laminillas sobre las cuales se cultivaron los monocitos. Luego se lavaron las laminillas y se observaron al microscopio de luz ultravioleta.

Desprendimiento de las células de los frascos de cultivo. Se utilizaron tripsina, EDTA y pronasa; también se ensayó solución salina fosfatada como se describió en bovinos (4) y lidocaína al 12 M como los describió Rinehart y cols. (29).

Producción de antisueros. Se cultivaron células en laminillas por 10 días y luego las laminillas se implantaron subcutáneamente en cerdos o en conejos. El procedimiento se repitió 3 veces en un período de dos meses y luego se colectó el suero. La presencia de anticuerpos se evaluó mediante la lisis dependiente de complemento.

Susceptibilidad a virus. Se utilizaron el virus de la enteritis hemorrágica del pavo, purificado o en forma del homogenizado de bazo y el virus CELO, ambos adenovirus aviares, en diferentes estados de diferenciación de las células.

Resultados

Descripción del cultivo. Al momento de la iniciación del cultivo las células no podían diferenciarse morfológicamente entre sí, excepto por unos pocos trombocitos elongados. A las tres horas de cultivo unas células pequeñas polimórficas se adhieren fuertemente al plástico (Figura 1a.). Estas células fueron clasificadas morfológicamente como trombocitos (7). A las 24 a 48 horas las células adherentes tempranas empiezan a destruirse y comienza a emerger un nuevo tipo de células adherentes; esta nueva célula crece en tamaño, presenta un gran número de vacuolas y acumula cantidades crecientes de partículas esféricas en su citoplasma. Estas células fueron clasificadas tentativamente como monocitos.

A los tres días después de la primera lavada, sólo unas pocas células no adherentes persisten en el cultivo conjuntamente con un cultivo de monocitos adherentes. Ahora estos monocitos presentan gran actividad de membrana (Figura 2a.), producen filipodios (Figura 2) y presentan un gran número de gránulos en su citoplasma (Figura 3a.). A partir de este momento empiezan a

observar dos tipos de comportamiento; primero, las células pueden seguir aumentando de tamaño y acumulando desechos celulares en su citoplasma y se observan fusión celular (Figura 3b. y 4a.) y células gigantes (Figuras 4b. y 5a.). Alternativamente, las células pueden extender su citoplasma, arreglar las partículas y vacuolas alrededor del núcleo en forma circular (Figura 5b.) y eventualmente formar una monocapa (Figura 5c.).

En primer caso la longevidad del cultivo fue menor que en el segundo caso, pues las células gigantes se lisan muy pronto y con ello se inicia una cadena de eventos que conduce a la degeneración total del cultivo. En algunos casos, alrededor del día 9, aparecen en células con morfología de fibroblastos que forman colonias definidas de muy rápido crecimiento (Figura 6a.). Las circunstancias que conducen a la aparición de estos "fibroblastos" no pudieron ser identificadas, pero se observó su crecimiento solamente, pero no siempre, en cultivos de aves adultas (9-12 semanas de edad).

Fagocitosis y receptores Fc. La capacidad fagocítica de los monocitos/macrófagos se probó a diferentes tiempos de cultivo.

La fagocitosis de *Moraxella bovis* (Figura 8B) latex, glóbulos rojos de oveja, levaduras y zimosan se pudo observar claramente (Figuras 6b, 6c, 7a 7b). En este tipo de células, como en los macrófagos bovinos obtenidos de la glándula mamaria, se observó que la *Moraxella bovis*, una vez en el interior del fagocito, lo destruye y gana de nuevo su libertad (resultados no incluidos). Los receptores Fc fueron demostrados mediante la formación de rosetas como puede verse en las Figuras 7c y 7d.

Esterasas no específicas, diamina férrica y naranja de acridina. Los monocitos de pavo sólo tiñen en forma débil con reactivos para esterazas no específicas; sólo unas pocas células en el cultivo mostraron un leve color rosado, a diferencia de monocitos de sangre periférica de humanos que se usaron como control. Las células no reaccionaron con diamina férrica; en cambio la naranja de acridina fue muy útil para hacer la diferenciación entre monocitos, trombocitos y linfocitos. Los monocitos se colorean rojo brillante en el citoplasma y de verde en el núcleo; en cambio el núcleo de los linfocitos tiñe de color verde con solo, aunque no

siempre, uno o unos pocos gránulos rojos muy discretos (Figura 8a.); los trombocitos por su parte, además de su pleomorfismo con predominio de formas ovaladas y en uso, tiñen su núcleo verde con uno o unos pocos gránulos rojos en un polo de su citoplasma. Los "fibroblastos" tiñen verde su núcleo y rojo intenso el citoplasma.

Separación de las células del frasco de cultivo. Ninguno de los tratamientos fue eficiente para remover las células adherentes lo cual impidió estudios cuantitativos. La tripsina, sin embargo fue capaz de remover los "fibroblastos" y así se comprobó que estas células pueden mantenerse por varias generaciones mediante pases sucesivos.

Antisuero. Tanto los conejos como los cerdos produjeron anticuerpos contra los leucocitos del pavo, lo cual pudo demostrarse por la agregación de las células y por la lisis dependiente de complemento. No se ha hecho caracterización adicional de estos reactivos.

Efecto de lectinas y de otras sustancias. No hubo un efecto visible de la fitohemaglutinina, la concavalina A o el Lipopolisacárido cuando estas sustancias se agregan a un cultivo establecido de monocitos, pero si los mitógenos se agregan al principio del cultivo se pueden observar efectos dramáticos: la fitohemaglutinina y la concanavalina agregan fuertemente los leucocitos y demoran la diferenciación de los monocitos. Aparentemente los agregados se forman alrededor de los monocitos. El Lipopolisacárido tiene la tendencia a mejorar la densidad y la longevidad de los trombocitos pero este efecto desaparece después de 3 a 4 días sin cambio aparente en la población de monocitos. El 2-mercaptoetanol no tiene un efecto visible en los primeros 3 días pero las células mueren en unos pocos días más. El carrageenan no tiene un efecto muy conspicuo en las primeras 48 a 72 horas pero luego paraliza la diferenciación celular y se acumulan los restos celulares en el cultivo.

Columnas de lana de vidrio y de nylon. El fraccionamiento de las células sobre estas columnas fue eficiente en cuanto a la cantidad de células recuperadas, especialmente las fracciones no adherentes y levemente adherentes; estas fracciones se obtienen

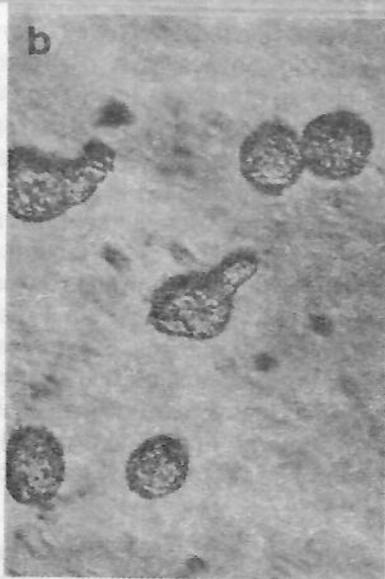
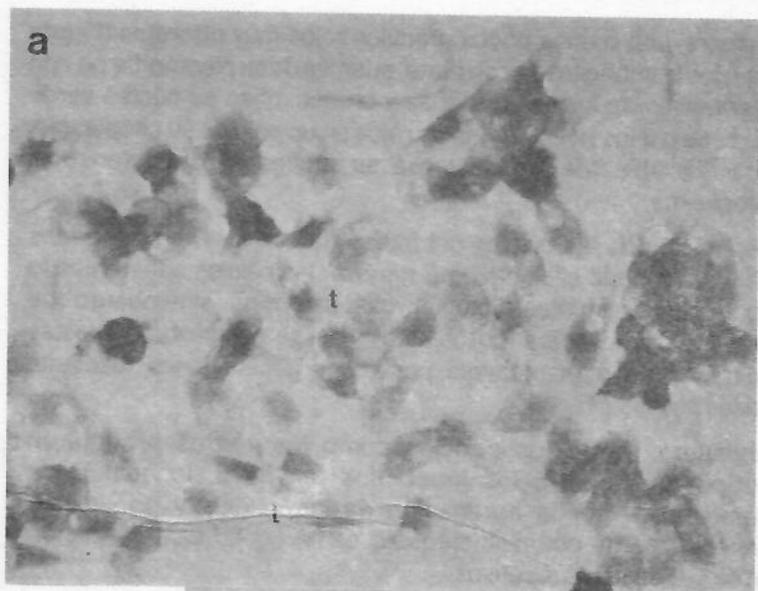


Fig. 1. a) Leucocitos adherentes tempranos de pavo. La mayoría de las células tienen características morfológicas de trombocitos (t). b) Microfotografía de contraste de fase después de tres días en cultivo.

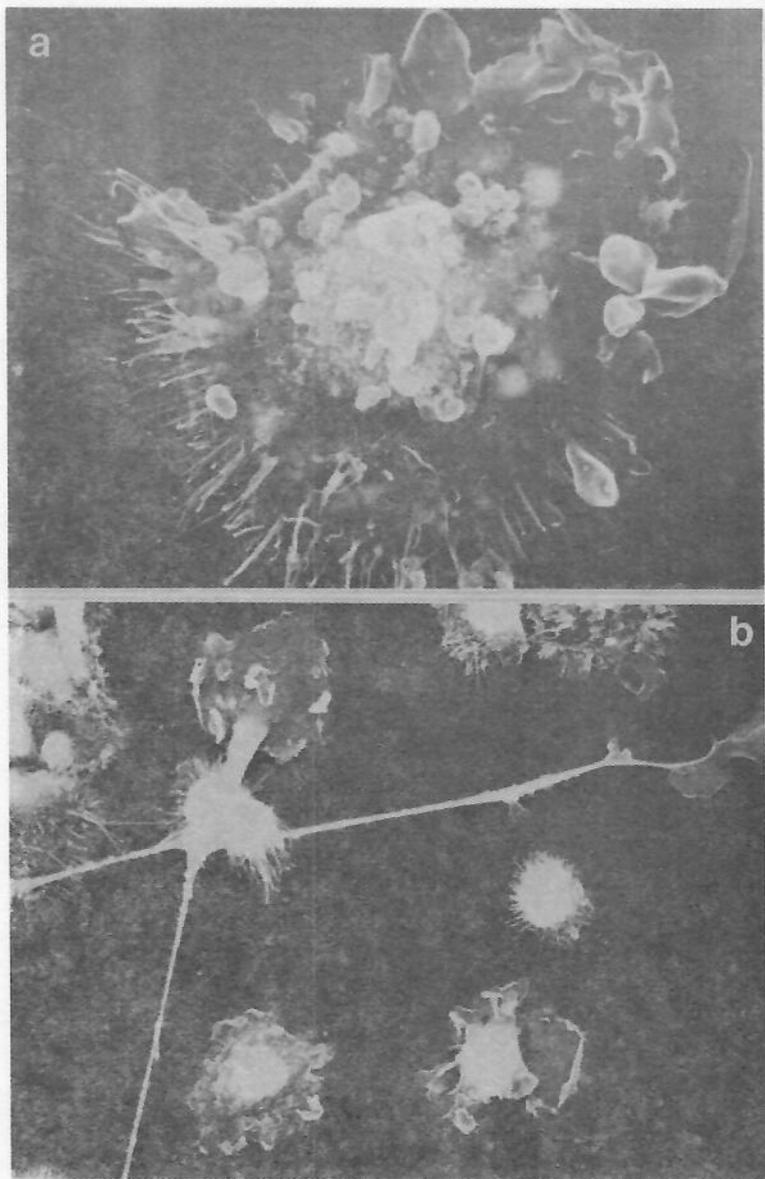


Fig. 2. Microscopía electrónica de barrido de monocitos de pavo después de seis días de cultivo. a) 2.200X y b) 720X.

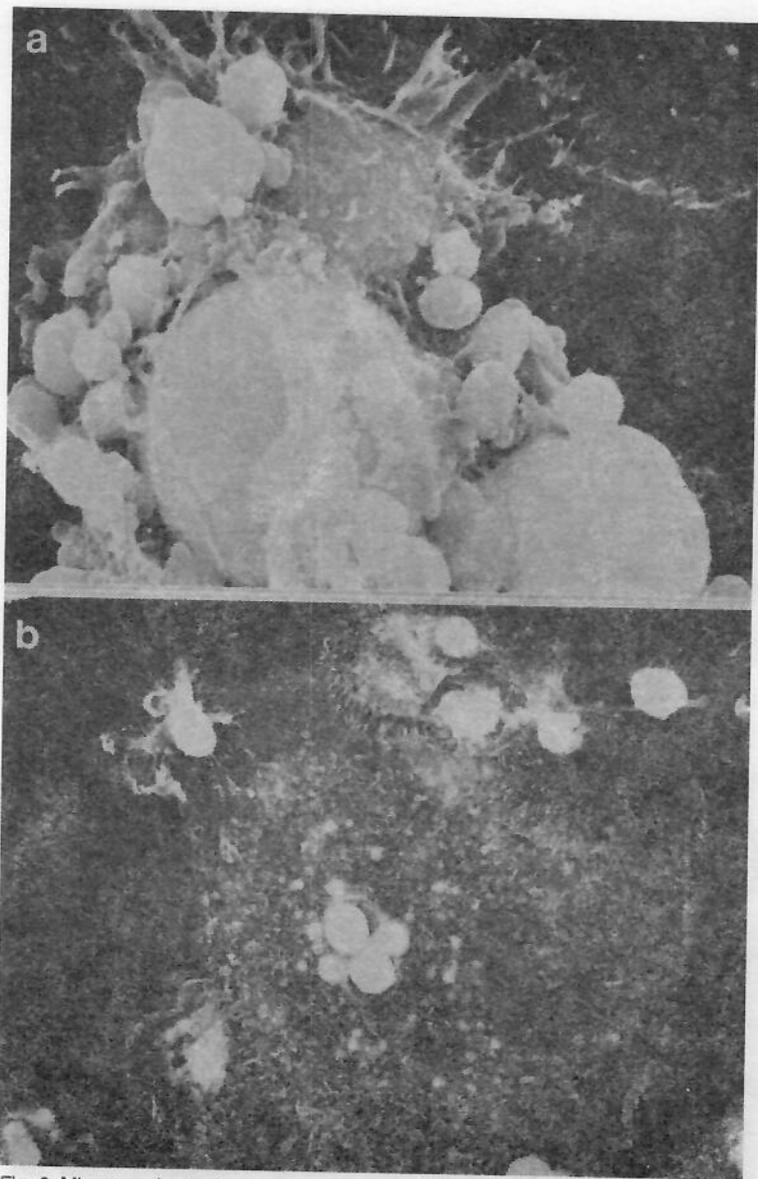


Fig. 3. Microscopía electrónica de barrido de eritrocitos de pavo después de seis días de cultivo. a) Gránulos y partículas en el citoplasma 6.000X. b) Fusión de células 600X.

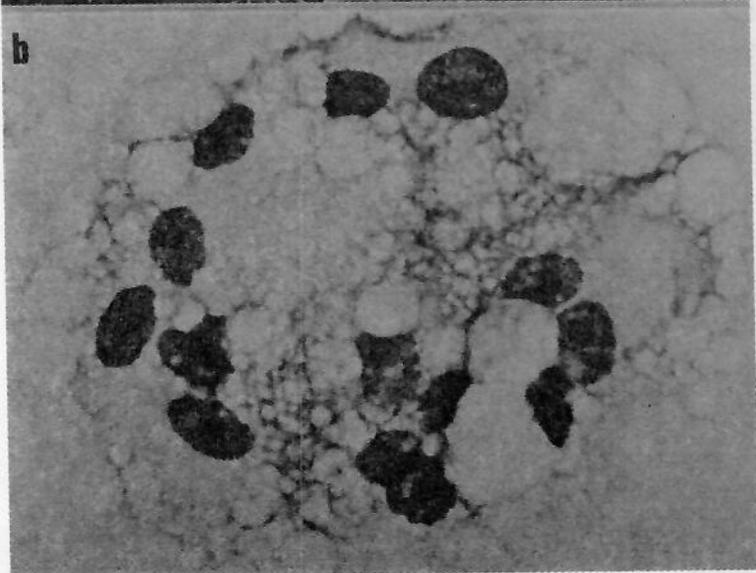
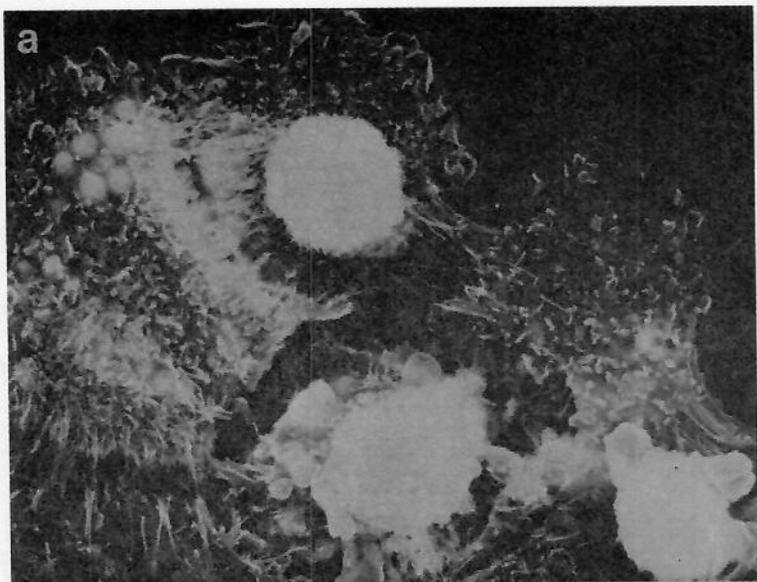


Fig. 4. a) Microscopía electrónica de barrido ilustrando la fusión de monocitos de pavo después de seis en cultivo 2.000X. b) Microfotografía de luz de una célula gigante en un cultivo de monocitos de pavo.

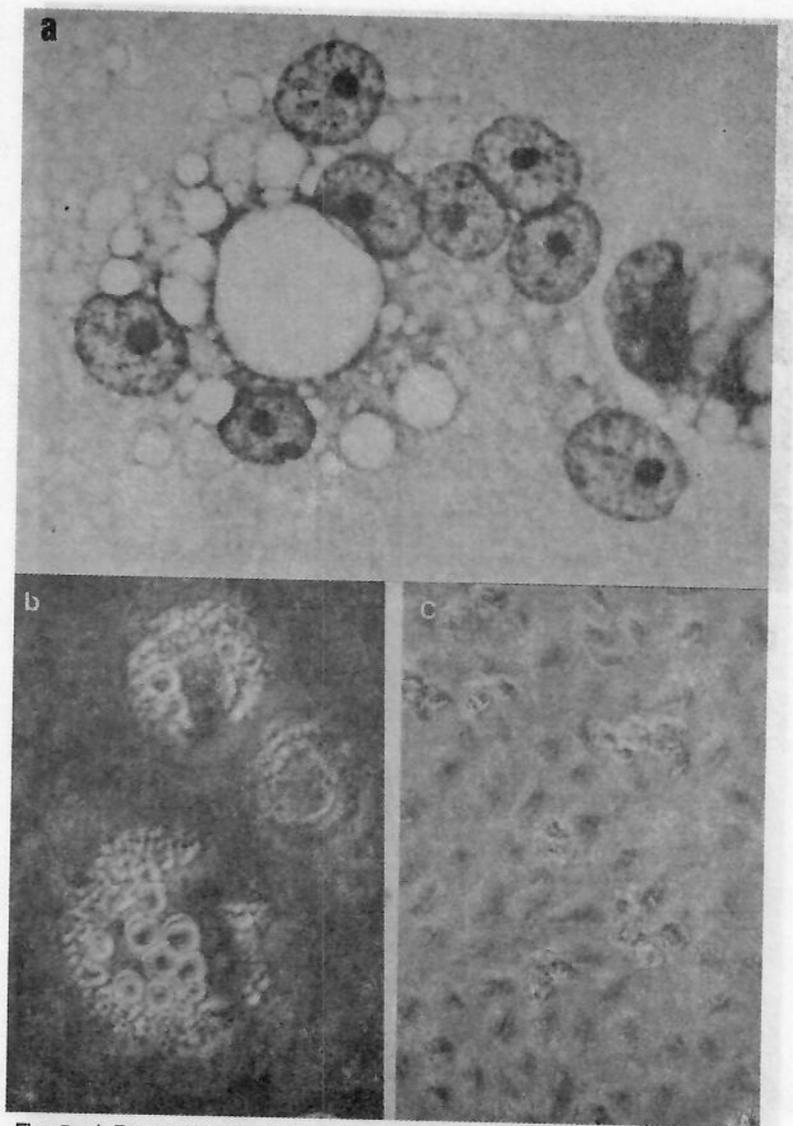


Fig. 5. a) Formación de células gigantes por monocitos de pavo in vitro. b) Fotografía de contraste de fase de monocitos de pavo in vitro después de ocho días en cultivo. Nótese un citoplasma extendido y el arreglo de vacuolas, gránulos y partículas alrededor del núcleo. c) Monocapa de monocitos de pavo diez días después de iniciado el cultivo.

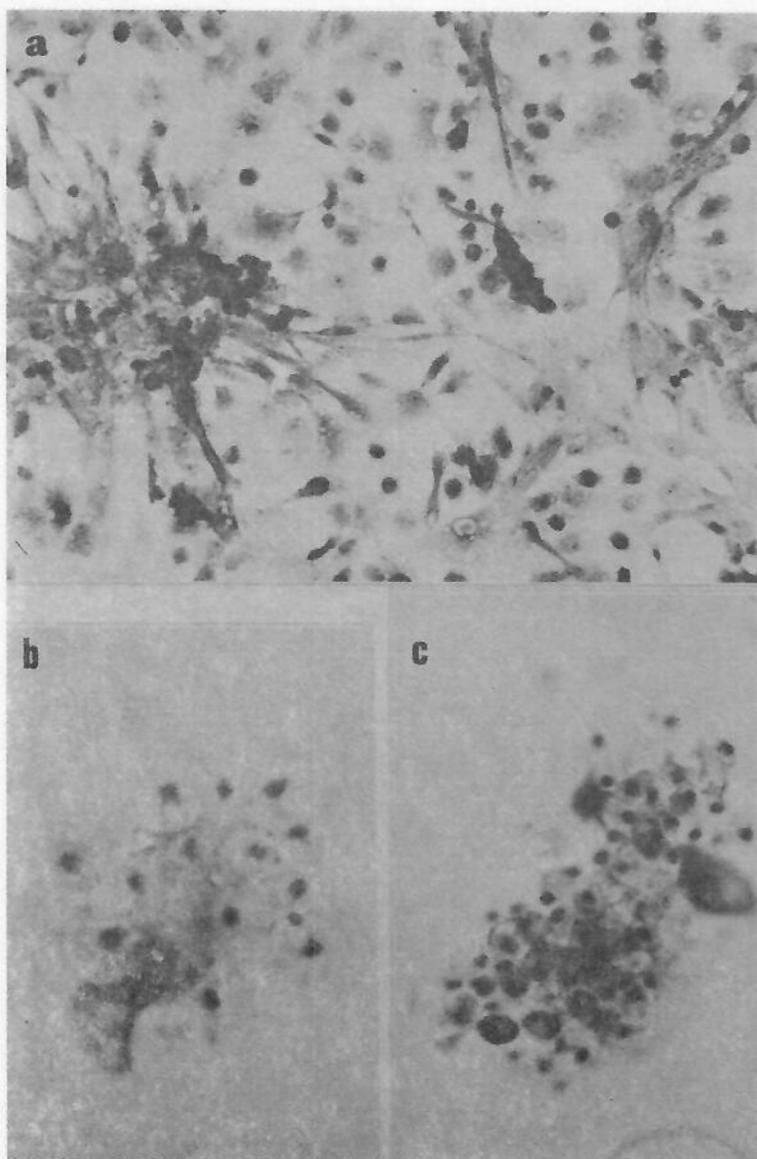


Fig. 6. a) Células fibroblastoides en un cultivo de monocitos de pavo doce días después de la iniciación del cultivo. Fagocitosis de b) levaduras, c) partículas de zimosán, por macrófagos de pavo cultivados in vitro.

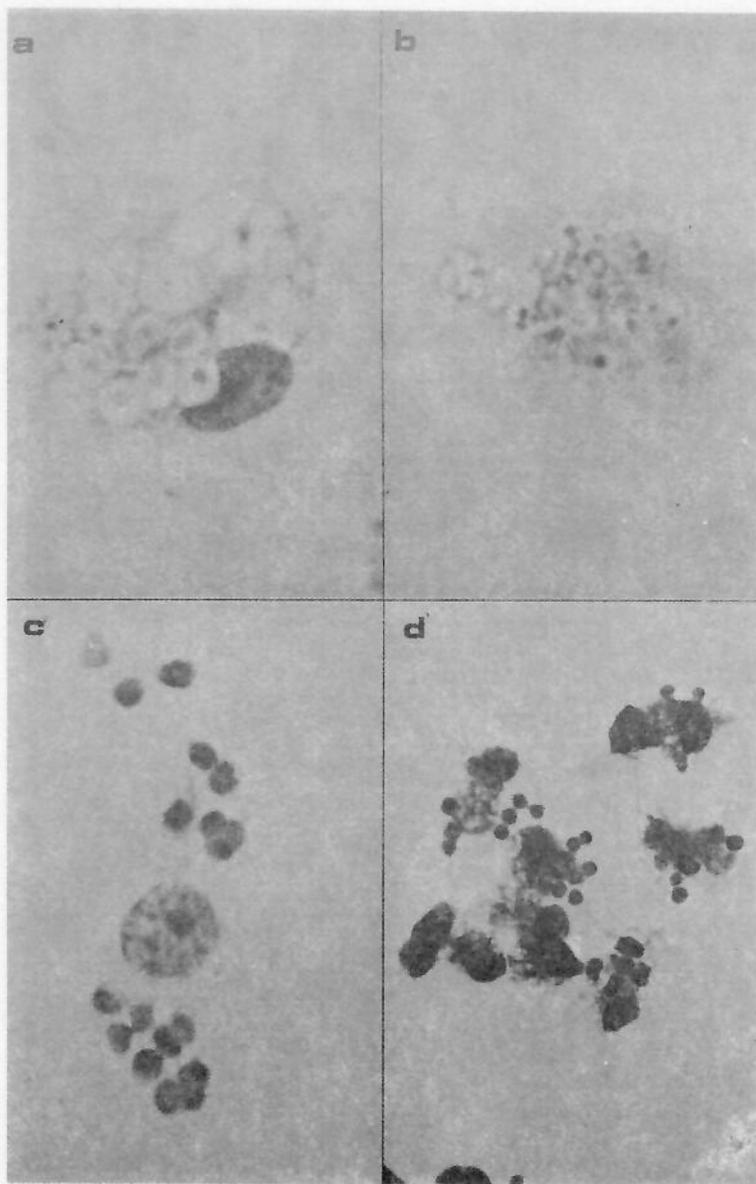


Fig. 7. Fagocitosis de: a) glóbulos rojos de oveja, b) partículas de látex, por monocitos/macrófagos de pavo. c) y d) rosetas Fc.

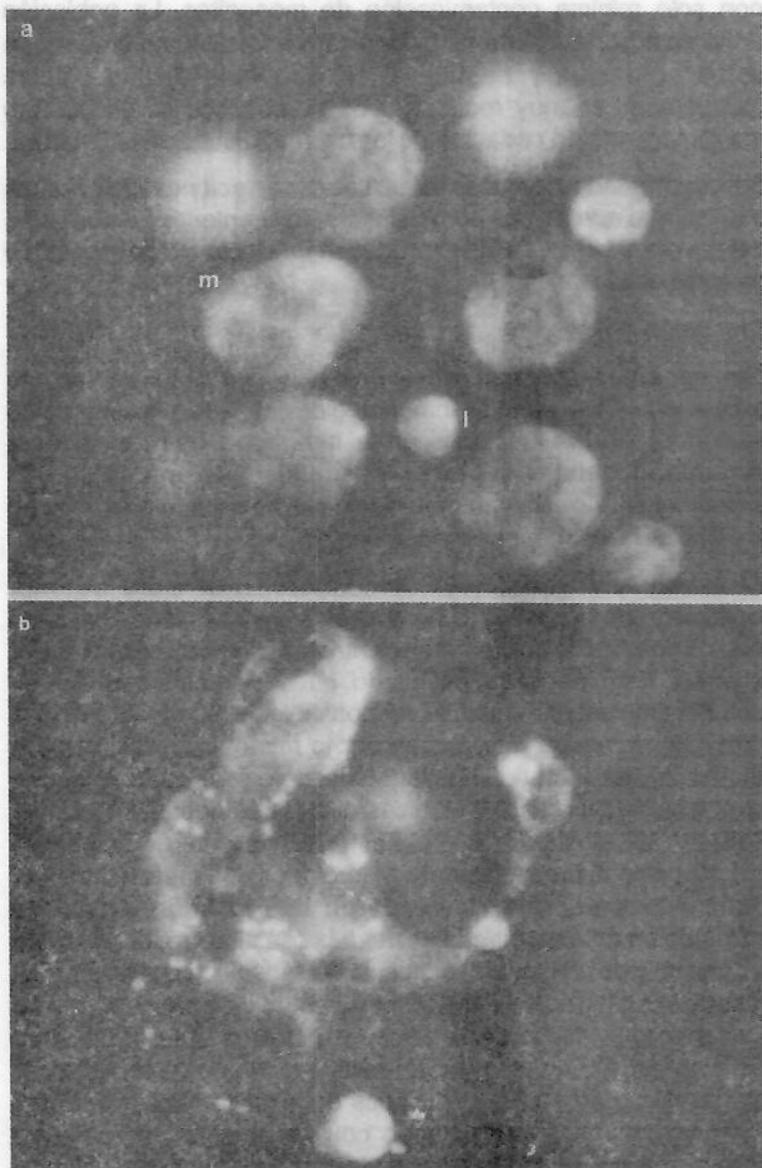


Fig. 8. a) Monocitos (m) y linfocitos (l) de pavo teñidos con naranja de acridina. b) monocito/macrófago cultivado por seis días y teñido con naranja de acridina. Nótese microorganismos (*Moraxella bovis*) fagocitados.

con solo mínima contaminación de monocitos. La población adherente por su parte no puede removerse eficientemente de estas columnas y finalmente la viabilidad de las células recuperadas es muy reducida. Los trombocitos se encuentran indistintamente en cada una de las tres fracciones mencionadas.

Susceptibilidad a agentes virales. Las observaciones preliminares indican que adenovirus como el virus de la enteritis hemorrágica del pavo o el virus CELO, no producen un efecto citopático visible en estas células.

Discusión

Las especies aviares representan un modelo de interés excepcional para estudios inmunológicos, debido a la separación anatómica de las funciones de la inmunidad humoral y de la inmunidad celular y por la posibilidad de manipulación experimental. De esta característica no se ha sacado provecho en el estudio de los monocitos/macrófagos.

Virolainen y Defendi (46) demostraron que para obtener replicación de macrófagos peritoneales era necesario el uso de medios condicionados (sobrenadante de cultivos de células L, por ejemplo). Este medio condicionado, supuestamente contiene un factor estimulante de colonias responsable del efecto. Stanley en 1981 (38) demostró que existen por lo menos cuatro subclases diferentes del factor estimulante de colonias, cada uno con características físicas y biológicas diferentes. Además Stanley y Guilbert (39) mostraron que el Factor estimulante de colonias-1 estimula sólo el crecimiento de macrófagos. Más recientemente, Tushinkí y cols. (43) demostraron que la sobrevivencia y proliferación de macrófagos de médula ósea *in vitro*, depende de la presencia de un factor de crecimiento específico que las células destruyen en forma selectiva. En este estudio se encontró que el mantenimiento de las células a largo plazo no era posible si se cambiaba el 100% del medio de cultivo autólogo (preadaptado), tan pronto como 10 horas después de iniciado el cultivo. Estas observaciones están de acuerdo con informes anteriores de la literatura y sugieren que un factor (o factores) está siendo producido o que algunas interacciones celulares están teniendo lugar (o ambas cosas) en las primeras horas del cultivo.

Las principales características monocíticas de estas células son: 1) la morfología, 2) la adhesividad al plástico y la resistencia a la tripsina y a los quelantes del calcio, 3) la formación de células gigantes, 4) el potencial fagocítico, 5) la presencia de receptores Fc, 6) el patrón de coloración con naranja de acridina y 7) el comportamiento de las células en presencia de carrageenan. No conocemos reportes de la literatura que indiquen que los monocitos de pavo sean esterase positivos, pero aparentemente no lo son según nuestros resultados. Los resultados negativos de la diamina férrica que es específica para compuestos sulfatados es una indicación de que el cultivo no está contaminado con mastocitos. En general los resultados sobre la morfología y el comportamiento de estas células no difiere de los descritos por Grecchi y Cols. (17) y Burkhardt (7) en gallinas; Ho y Babiuk (19) en perros y Birmingham y Jeska (5) en bovinos.

Los cultivos duran más tiempo si las células optan por no fagocitosis de restos celulares, no fusión y no formación de células gigantes. Esto puede ser estimulado evitando la mortalidad de células durante el procesamiento y haciendo un lavado intenso pero muy suave de las células al tercer día.

El tratamiento de células en columnas conduce a cultivos de muy corta duración, lo cual podría explicarse por la mayor mortalidad celular, o por la exclusión de algunos leucocitos necesarios para producir o ayudar en las interacciones necesarias para la diferenciación de los macrófagos.

La presencia de "fibroblastos" en el cultivo fué inesperada, si bien células similares pueden obtenerse de sangre periférica de bovinos y cerdos (1, 5, 50). Parece, según nuestras observaciones que los monocitos/macrófagos se transforman en fibroblastos y luego empiezan una fase de replicación activa. El hecho que estos fibroblastos también fagociten es otra indicación de su origen en monocitos, pero otros estudios para, específicamente caracterizar estas células, no fueron realizados.

Todavía hay mucho espacio para el mejoramiento de los cultivos, haciéndolos más durables y predecibles. Sin embargo los resultados obtenidos con este sistema y particularmente por la sobrevivencia a largo plazo de estas células son un factor

estimulante para realizar algunos estudios sobre la función de estas células como presentadoras de antígeno y sus interacciones con otros tipos de leucocitos en el proceso de la respuesta inmune o en la reacción a mitógenos. Desde el punto de vista virológico estos cultivos pueden ser de utilidad para el estudio de las relaciones entre virus y macrófagos y particularmente para poner a prueba el concepto de la llamada resistencia intrínseca y extrínseca de los macrófagos frente a los agentes virales.

Referencias

1. Asagba, M. O., Y. K. Setongo, R. H. Jhonsosn, and J.R. Smith. A simple procedure to obtain continuous cell lines from peripheral blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2: 87-94, 1981.
2. Asano, Y., K. Okumura, and T. Tada. la antigen-presenting cells do not carry the same la specificities as detected on suppressor and helped cells. *Scand. J. Immunol.* 13: 353-359, 1981.
3. Beller, D. I., J. M. Kiely, and E. R. Unanue. Regulation of macrophage populations. I. Preferential induction of la rich peritoneal exudates by immunologic stimuli. *J. Immunol.* 124: 1426-1432, 1980.
4. Bendixen, P. H. Reversible detachment of blood macrophages by replacement of culture medium with phosphate-buffered saline solution. *Am. J. Vet. Res.* 42: 687-688, 1981.
5. Brimingham, J. R., and E. L. Jeska. The isolation, longterm cultivation and characterization of bovine peripheral blood monocytes. 41: 807-814, 1980.
6. Bonta, I. L. and M. J. Parham. Immunodulatory-antiinflammatory functions of E type prostaglandins. Minireview with emphasis on macrophage-mediated effects. *Int. J. Immunophac.* 4: 103-109, 1982.
7. Burkhardt, E. Scanning and transmission electron microscopy of glass bead column-separated monocytes from mononuclear leukocyte suspensions of peripheral blood of the chicken. *J. Ret. End. Soc.* 28: 103-109, 1980.
8. Carrel, A., and A. H. Ebeling. Pure culture of large mononuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 36: 365-370, 1922.
9. Citron, M. O. and J. G. Michael. Regulation of the inmune response to bacterial lipopolysaccharide by adherent cells. *Infect. Immun.* 33: 519-522, 1981.

10. Czarnetzki, B. M. In vitro generation of eosinophil chemotactic factor from human and murine phagocytes. *Scand. J. Immunol.* 13: 511-516, 1981.
11. Davies, P. and R. J. Bonney. Secretory products of mononuclear phagocytes: a brief review. *J. Ret. End. Soc.* 26: 37-47, 1979.
12. Defendi, V. Macrophage cell lines and their uses in immunobiology. In: *Immunobiology of the macrophage*. D. S. Nelson, Ed. Acad. Press. New York. pp 275-290, 1976.
13. Falk, W., L. Harvath, and E. J. Leonard. Only the chemotactic subpopulation of human blood monocytes expresses receptors for the chemotactic peptide N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine. *Infect. Immun.* 36:450-454, 1982.
14. Fernández, L. A., and J. M. Maesween. The suppressive effect of monocytes in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Immunol.* 44: 653-659, 1981.
15. Germain, R. N. Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing, Ia restricted antigen presentation and a separate nonspecific 2nd signal. *Immunol.* 127:1964-1966, 1981.
16. Glick, B., K. Sato, and F. Cohenour. Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. *J. Ret. En. Soc.* 1:442-449, 1964.
17. Grecchi, R., A. M. Saliba, and M. Mariano. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *J. Pathol.* 130:23-31, 1980.
18. Hearts, J. E., G. A. Warr, and G. J. Jakab. Characterization of murine lung and peritoneal macrophages. *J. Ret. End. Soc.* 27:443-454, 1980.
19. Ho, C. H., and L. A. Babiuk. Long-term culture of canine peripheral blood monocytes in vitro. *Can. J. Comp. Med.* 43:223-228, 1979.
20. Hoover, D. L., R. Gunguli, and J. F. Foss. Microbicidal capacity and acid hydrolase content of human monocytes and peritoneal macrophages. *J. Ret. End. Soc.* 31:99-105, 1982.
21. Jakab, G. J., G. A. Warr, and P. L. Sannes. Alveolar macrophage ingestion and phagosome-lysosome fusion defect associated with virus pneumonia. *Infect. Immun.* 27:960-968, 1980.
22. Kwan, E. and R. I. Mishell. Fc and complement receptors. In: *selected methods in cellular immunology*. B. B. Mishell, and S. M. Shiigi, Eds. W. H. Freeman and company. San Francisco. pp 219-224, 1980.

23. Laughter, A. H., M. D. Lidsky, and J. J. Tworney. Suppression of immunoglobulin synthesis by monocytes in health and in patients with lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14:435-440, 1979.
24. Lee, K. C., M. Wong, and D. McIntyre. Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines. *J. Immunol.* 126:2474-2474, 1981.
25. Li, C. Y., K. W. Lam, and L. T. Yam. Esterases in human leukocytes. *J. histochem. cytochem.* 21:1-12, 1973.
26. Metschinkoff, E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contra l'invasion des microbes. *Ann. Inst. Pasteur.* 1:322-325, 1987.
27. Nelson, D. S. Nonspecific immunoregulation by macrophages and their products. In: *Immunobiology of the macrophage*. D. S. Nelson, Ed. Acad. Press. New York. pp 235-257, 1976.
28. Pierce, C. W., and J. A. Kapp. The role of macrophages on antibody responses in vitro. In: *Immunology of the macrophage*. D. S. Nelson, Ed. Acad. Press. New York. pp 1-33, 1976.
29. Rinehart, J. J., R. G. Gormus, P. Lange, and M. E. Kaplan. A new method for the isolation of human monocytes. *J. Immunol. methods* 23: 207-212, 1978.
30. Rosemberg, S. A., and P. E. Lipsky. The role of monocyte factors in the differentiation of immunoglobulin secreting cells from human peripheral blood. B. cells. *J. Immunol.* 125:232-237, 1980.
31. Roubin, R., J. Kennard, D. Foley, and S. Zolla-Pazner. Markers of macrophage heterogeneity; altered frequency of macrophage subpopulations after various pathologic stimuli. *J. Ret. End. Soc.* 29: 423-432, 1981.
32. Rumpold, H., O. Forster, G. Bock, P. Swetly, and M. Riedl. Antigenic heterogeneity of rat macrophages. A monoclonal antibody reacting only with alveolar but not with other types of macrophages. *Immunol.* 45:637-643, 1982.
33. Salahuddin, S. Z., P. D. Marhan, and R. C. Gallo. Establishment of long term monocyte suspension cultures from normal human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 155:1842-1857, 1982.
34. Sawicki, J. E., and P. J. Catanzaro. Selective macrophage cytotoxicity of carrageenan in vivo. *Int. Arch. Allergy.* 49:709-714, 1975.

35. Schroer, J., and A. S. Rosenthal. Function of macrophages as antigen presenting cells. *Spring. Sem. Immunopathol.* 3:247-264, 1980.
36. Shin, H. S., and Y. S. Chai. Role of monocytes on pokeweed mitogen-induced differentiation on human peripheral blood lymphocytes. *Cell Immunol.* 58:323-332, 1981.
37. Spicer, S. S., J. H., Hardin, and M. E. Stier. Ultrastructural visualization of sulfated complex carbohydrates in blood and epithelial cells with the high iron diamine procedure. *Histochem. J.* 10:435-452, 1978.
38. Stanley, E. R. Colony stimulating factors. In: *The lymphokines.* W. E. Stewart II, and J. W. adden Eds. Humana Press, Inc. Clifton. pp 102-132, 1981.
39. Stanley, E. R., and L. G. Guilbert. Regulation of macrophage production by a colony stimulating factor. In: *Mononuclear phagocytes-functional aspects.* Part I. R. van Furth, Ed. Martinus Nijhoff. The Hague. pp 415-433, 1980.
40. Stewart, C. C. The use of cloned mononuclear phagocytes to study immunoregulation. in *Macrophage regulation of immunity.* E. R. Unanue, and A. S. Rosenthal, Eds. Acad. Press. New York. pp 455-476, 1980.
41. Sutton, S. J., And L. Weiss. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epitheloid cells, and multinucleated giant cells. *J. Cell. Biol.* 28:303-332, 1966.
42. Thomas, Y., R. Hucket, and D. Grandjon. Role of adherent suppressor cells in the depression of cell-mediated immunity in Hodgkin's disease and lung carcinoma. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 132:167-180, 1981.
43. Tushinski, R. J., I. T. Oliver, L. J. Guilbert, P. W. Tynan, J. R. Warner, and E. R. Stanley. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the cells selectively destroy. *Cell.* 28:78-81, 1982.
44. Unkules, J. C. The presence of two receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity. *J. Exp. Med.* 145:931-947, 1977.
45. Van Furth, and A. Cohn. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128:415-433. 1968.
46. Virolainen, M., and V. Defendi. *Winstar Inst. Symp. Monogr.* 7:67-86, 1967.
47. Walker, S. W. Functional heterogeneity of macrophages. in *Immunobiology of the macrophage.* D. S. Nelson, Ed. Acad. press. New York, pp. 91-110, 1976.

48. Whaley, K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory protein of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* 151:501-516, 1980.
49. Whaley, K., D. Lappin, and T. Barkas. C2 synthesis by human monocytes is modulated by a nicotinic cholinergic receptor. *Nature*. 293:580-583, 1981.
50. Wardley, R. C., M. J. Lauman, and F. Hamilton. The establishment of continuous macrophage cell lines from peripheral blood monocytes. *Immunol.* 39:67-73, 1980.

8. EPILOGO: LAS AVES COMO MODELO DE INVESTIGACION BASICA Y DE INMUNOPATOLOGIAS CON APLICACION AL HOMBRE

Después de haber revisado brevemente los aspectos más importantes de la inmunología aviar, desde el punto de vista aplicado a la producción pecuaria, permítaseme tomar el concepto de la inmunología como modelo de investigación básica con posibles aplicaciones a los mamíferos, entre ellos el hombre.

Como dijimos en un principio la existencia de un sitio específico para la maduración de los linfocitos B y las posibilidades de manipulación experimental, ha llevado a demostraciones trascendentales como la inmigración de linfocitos a la bursa y al timo, con base en quimeras de gallina-codorniz; un modelo experimental de gran exquisitez y belleza.

En la actualidad, quizá el problema más importante de la inmunología que sigue sin una explicación es el fenómeno de la tolerancia inmunológica; si bien sabemos que es durante la evolución ontogénica de los linfocitos T cuando se "aprende" a reconocer y tolerar lo propio, todavía no tenemos la explicación acerca de cómo ocurre este reconocimiento.

En embriones de pollo es fácil producir parabiontes, que son pollos unidos por anastomosis. Estos pollos, como ocurre naturalmente en mellizos bovinos, adquieren tolerancia a su compañero de incubación/gestación y esto tiene gran potencial como modelo para avanzar el estudio de la tolerancia. En este mismo sentido se

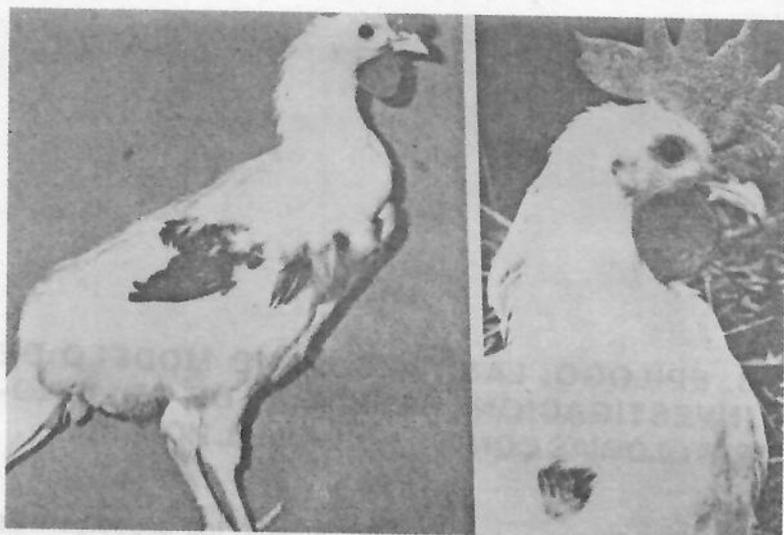


Fig. 1. Quimera gallina-codorniz. A la izquierda una gallina que recibió, durante la vida embrionaria, un trasplante de ala y timo de un embrión de codorniz. A la derecha un ave que recibió solamente el implante de ala y presentó necrosis completa a los tres meses.

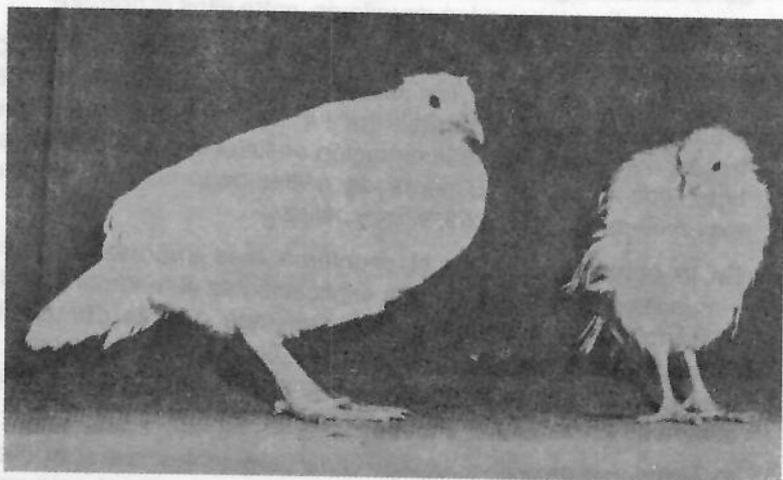


Fig. 2. Gallina Obesa, a la derecha. Estas aves presentan retardo en el crecimiento y, por la sensibilidad a la temperatura, ocurre el erizamiento de las plumas. Compárese con su compañera normal, de la misma edad y sometida al mismo régimen alimenticio.

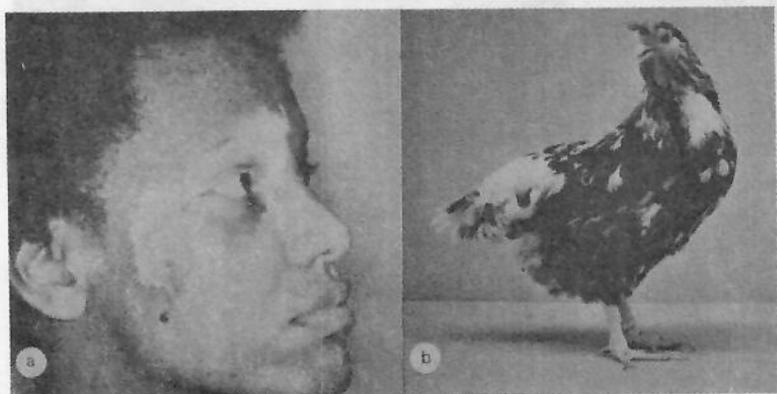


Fig. 3. Vitiligo en una mujer de 25 años de edad y en una gallina de 8 meses. Este tipo de amelanosis se da en la gallina Smyth y en por lo menos en el 1% de la población humana.

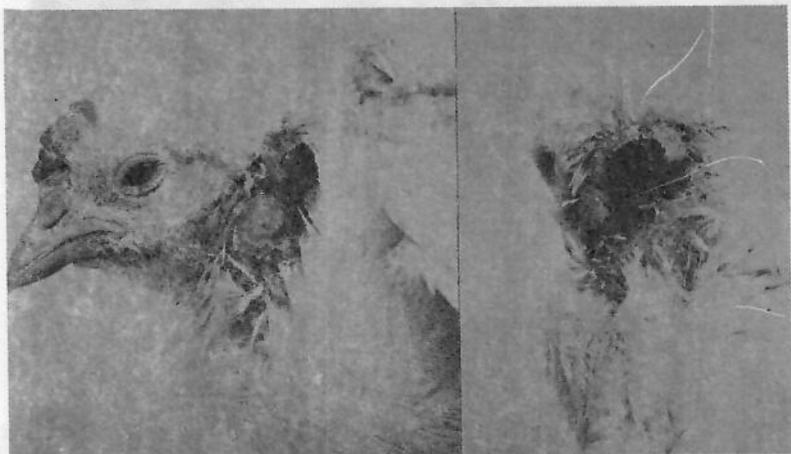


Fig. 4. Gallina de la línea 200 con las lesiones clásicas del escleroderma; necrosis de la cresta y del cuello.

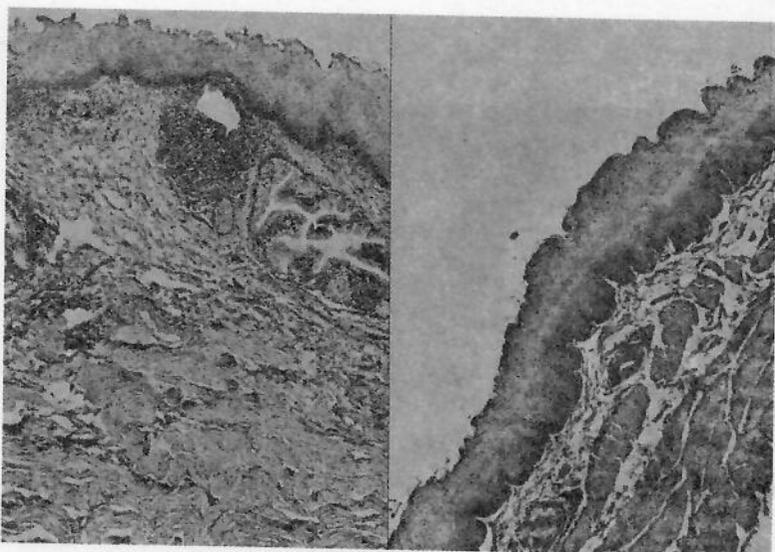


Fig. 5. Corte de esófago en un ave de un año de edad con escleroderma. Nótese el infiltrado de mononucleares y el aumento del colágeno. Compárese con un ave normal de igual edad a la derecha.

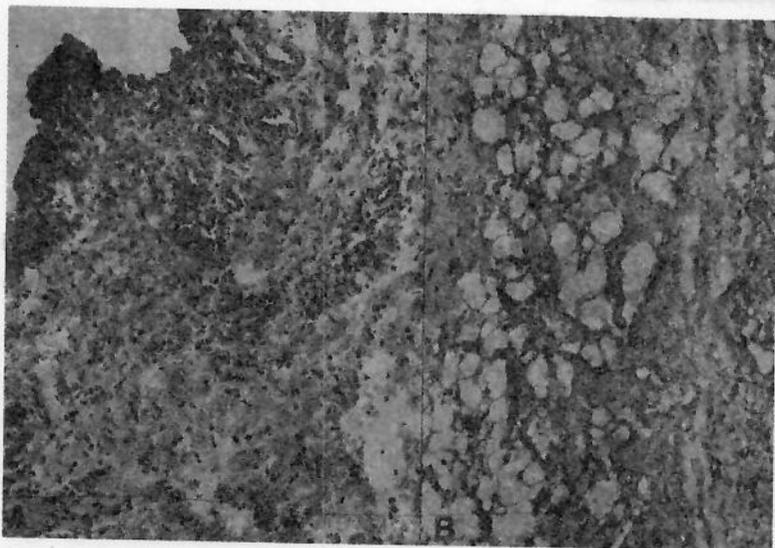


Fig. 6. Tejido sinovial de un ave de 6 meses de edad. la izquierda hay hipersensibilidad y aumento de colágeno; mientras que el control de la derecha muestra un tejido graso normal.

ha informado de trasplantes entre embriones de gallinas alogénicas y entre gallina y codorniz (xenogénicas) de alas, que en el caso de gallina-gallina se aceptan indefinidamente, pero en el caso de gallina-codorniz son rechazados en forma crónica. Sin embargo, si simultáneamente con el trasplante de ala se hace un trasplante parcial de timo del mismo donador, el trasplante gallina-codorniz sobrevive indefinidamente (Figura 1). Este modelo experimental corrobora la importancia del timo para reconocer y tolerar lo propio, y podría servir de base para estudios adicionales sobre este problema.

Finalmente mencionemos que las aves, por la facilidad que ofrecen para estudios clínicos y genéticos han sido propuestas como modelo para el estudio comparado de varias patologías humanas, entre ellas la enfermedad de Hashimoto, el vitiligo y el escleroderma están asociadas con procesos inmunopatológicos. Veamos muy superficialmente las características más importantes de estos modelos.

Enfermedad de Hashimoto. Se trata de la tiroiditis autoinmune espontánea hereditaria, asociada con hipotiroidismo que desarrolla el 90% de machos y hembras de la cepa OS de gallinas leghorn blancas. La glándula tiroides se encuentra infiltrada con linfocitos y células plasmáticas hasta en un ciento por ciento en la séptima semana de vida. Las células plasmáticas infiltrantes producen anticuerpos contra tiroglobulina. Los animales con este tipo hipertiroidismo no crecen normalmente, tienen depósitos de grasa en abdomen y subcutáneamente, por lo cual se las llama obesas (obese strain OS); además tienen anomalías en las plumas, son muy sensibles a los cambios de temperatura y son pobres ponedoras de huevos (Figura 2).

Vitiligo. La gallina smyth, también llamada amelanica, es normal al momento del nacimiento, pero una semana después muestra daños en melanocitos, a nivel de las plumas y de los folículos pilosos. Los melanosomas son autofagocitados por los melanocitos y estos se degeneran y mueren. El proceso está acompañado de infiltración de linfocitos a la pulpa de la pluma y la coroides. A los seis meses la decoloración es obvia en las plumas y en los ojos. La bursectomía neonatal disminuye el

proceso patológico pero no lo evita completamente. Las aves afectadas muestran un alto índice de ceguera y pérdida de plumas en un proceso similar a la alopecia areata del hombre. El origen o tipo de daño genético de este síndrome no se ha caracterizado aún, pero por lo menos el 1% de la población humana sufre esta condición y generalmente en asociación con otros problemas autoinmunes (Figura 3).

Escleroderma. El escleroderma de la gallina se ha sugerido como modelo para el estudio de la esclerosis progresiva sistémica del hombre, caracterizada por fibrosis de la piel y de otros órganos. En la gallina el problema se manifiesta por la pérdida de la cresta. A partir de las dos semanas de vida se inician una serie de cambios patológicos como edema, eritema y necrosis de la cresta; también aparecen pollartritis, edema, necrosis y pérdida de plumas alrededor del cuello. El daño de la cresta ocurre en el 90% de las aves de la cepa L 200 (Universidad de California, Davis), mientras que los cambios adicionales ocurren en el 45% de las aves a las siete semanas. Igualmente puede haber daños en órganos internos como el esófago, intestino delgado, pulmón, riñón y testículos. La observación microscópica revela un infiltrado de mononucleares, fibrosis y oclusión vascular. Muchas de estas aves desarrollan anticuerpos antinucleares, factor reumatoideo y anticuerpos contra el colágeno (Figuras 4, 5 y 6).

La inmunología aviar es pues, una fuente de información con gran potencial de aplicación a la industria avícola y a la industria de productos biológicos, además de su gran potencial para proseguir el escrutinio de los fenómenos básicos del sistema inmune.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ONTOGENIA Y FUNCION DE LA BURSA DE FABRICIO

Ambrosius, H. and D. Hadge. (1982) A phylogenetic view of avian immunology. *Folia Biol.* 28:1 - 21.

Belo, M., Martin C., Corbel C. and N. Le Douarin. (1985). A novel method to bursectomize avian embryos and obtain quail-chick bursal chimeras. *J. Immunol.* 135:3785-3794.

Bhanushali, J. K., Murthy, K.K, and W.L. Ragland. (1985) The effects of in ovo mibolerone treatment on the bursa o Fabricius and the humoral immune system of chickens: A dose-response study. *Immunopharmacol.* 10:99-110.

Biggs, P.M. (1982) The world of poultry disease. *Avian Pathol.* 11:281-200.

Ekino, S, Suginojara, K, Urano T, et al. (1985) The bursa of Fabricius: a trapping site for environmental antigenes. *Immunol.* 55:405-410.

Firth, G.A, (1977) The normal lymphatic system of the domestic fowl. *The Vet. Bull.* 47:167-179.

Fleischer, B. (1981) The avian immune system. *Immunol. Today* 2:195-200.

Hasimoto, Y. and Sugimura, M. (1976) Histological and quantitative studies on the postnatal growth of the thymus and the bursa of Fabricius of the white pekin ducks. *Jap. J. Vet. Res.* 24:65-76.

Heller E. D, and M. Perek (1973). The effect of bursa Fabricius removal in day-old chicks upon growth performance, blood and spleen characteristics. *Poultry Sci.* 52:1065-1068.

Houssaint, E, Torano, A, and J. Ivanyi. (1983) Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius. *Eur. J. Immunol.* 13:590-595.

Lerner, K. G., Glick, B., and F. C. McDuffie. (1971) Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity. *J. Immunol.* 107:493-503.

Lupetti, M., Dolfi, A., Malatesta, T., et al. (1984) On the role of the lymphoid follicle-associated areas in the organization of the bursal follicle in the cloacal bursa. *Anat. Anz, Jena* 157:291-297.

Mansikka, A., Veromaa, T., Vainio, O. and Toivanen, P. (1989) B-cell differentiation in the chicken: expression of immunoglobulin genes in the bursal and peripheral lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 29:325-331.

Matsuda, H., and Y. Bito (1973) Different effects of bursectomy of chickens on immune response to Newcastle disease virus and *Salmonella pullorum* antigens. *Poultry Sci.* 52:1042-1052.

Naukarinen, A., and T. E. Sorvari. (1984) Involution of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopy study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. *J. Leuk. Biol.* 35:281-290.

Peleg, B. A., Heller, E.D and Pitkovsky, J. (1985) The ontogeny of the humoral immune response to *E. coli* vaccine and to sheep red blood cells in young chicks. *Avian Pathol.* 14:471-481.

Pink, J.R.L. (1986) Counting components of the chicken's B cell system. *Immunol. Rev.* 91:115-128.

Ratcliffe, M.J.H. (1985) The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. *Immunol. Today.* 6:223-227.

Sachs, H. G., Beezhold, D. H., and Van Alten, P.J. (1979) The effect of cyclophosphamide on the structure and function of the bursal epithelium. *J. Reticul. Soc.* 26:1-9.

Schaffner, T., Mueller, J., Hess, M.W., et al (1974) The bursa of Fabricius: A central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content. *Cell. Immunol.* 13:304-312.

Toivanen, P., Toivanen A., and R. A. Good. (1972) Ontogeny of bursal function in chicken III. Immunocompetent cell for humoral immunity. *J. Exp. Med.* 136:816-831.

Weill, J. C. and Sugimura, M. (1976) Histological and quantitative studies on the postnatal growth of the thymus and the bursa of Fabricius of the white pekin ducks. *Jap. J. Vet. Res.* 24:65-76.

Weil, J. C. and C. A. Reynaud. (1987) The chicken B cell compartment. *Science* 238:1094-1098.

ONTOGENIA Y FUNCION DEL TIMO

Firth, G. A. (1977) The normal lymphatic system of the domestic fowl. *The Vet. Bull.* 47:167-179.

Fleischer, B. (1981) The avian immune system. *Inmunol. Today* 2:195-200.

Kendal, M. D. (1980) Avian thymus glands. *Develop. Comp. Immunol.* 4:191-210.

Lillehoj, H. S., Lillehoj, E. P., Weinstock, D. and Schat, K. A. (1988). Functional and biochemical characterizations of avian T lymphocyte antigens identified by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18:2059-2065.

Nakamura, K., Imada, Y. and Maeda, M. (1986) Lymphocytic depletion of bursa of Fabricius and thymus in chickens inoculated with *Escherichia coli*. *Vet. Pathol.* 23:712-717.

Nowak, J. S., Lassila, O., Vainio, O., Granfors, K. and Toivanen, P. (1982) IgG Fc receptor-bearing cells during early lymphoid cell development in the chicken. *Cell. Immunol.* 74:198-203.

Peault, B., M., and Le Douarin, N. M. (1982) Tissue distribution and ontogenetic emergence of differentiation antigens on avian T cells. *Eur. J. Immunol.* 12:1047-1050.

Sharma, J. M. and Tizard, I. (1984) Avian cellular immune effector mechanisms-A review. *Avian Pathol.* 13:357-376.

FASE INDUCTORA Y FASE EFECTORA DE LA RESPUESTA INMUNE

ORGANOS LINFOIDES PERIFERICOS

Befus, A. D., Johnston, N., Leslie, G. A., and Bienesstock, J. (1980). Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of the Peyer's patches. *J. Immunol.* 125:2626-2632.

Burns, R. B. (1982) Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) *Res. in Vet. Sci.* 32:359-367.

Gallego, M., and Glick, B. (1988) The proliferative capacity of the cells of the avian Harderian gland. *Develop. Comp. Immunol.* 12:157-166.

Mansikka, A., Sandberg, M., Veromaa, T., Vainio, O., Granfors, K. and Toivanen, P. (1989) B cell maturation in the chicken Harderian gland. *J. Immunol.* 142:1826-1833.

Olah, I., and Glick, B. (1984) Lymphopineal tissue in the chicken. *Develp. Comp. Immunol.* 8:855-862.

Romppanen, T. and Sorvari T. E. (1981) A morphometrical study of the chicken spleen with special reference to the bursa dependence of the white pulp. *Inter. Arch. Allergy Applied Immunol.* 65:349-358.

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Briles, W. E., Briles, R. W. and Tffs, R. E. (1983) Resistance to a malignant lymphoma in chickens is mapped to subregion of major histocompatibility (B) complex. *Science* 219:977-978.

Guillemot, F., and Auffray, C. (1989) A molecular map of the chicken B complex. In: *Recent advances in avian immunology research*. Bhogal, B. S. and Koch G. Eds. Alan R. Liss. New York pp. 169-176.

Hála, K., Boyd, R. L., Wolf, H., Böck, G. and Wick, G. (1984) Functional analysis of B-L (Ia-like) antigen bearing chicken peripheral blood cells. *Scand. J. Immunol.* 20:15-19.

Hála, K., Sgonc, R., Auffray, C. and Wick G. (1989) Typing of MHC haplotypes in OS chicken by means of RFLP analysis. In: *Recent advances in avian immunology research*. Bhogal, B. S. and Koch, G. Eds. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 177-186.

Lehtonen, L., Vainio, O., Veromaa, T. and Toivanen, P. (1989) Tolerance to class I major histocompatibility complex antigens in chicken B cell chimeras. Effect of B cell depletion on transferability of tolerance. *Eur. J. Immunol.* 19: 425:431.

Sgonc, R., Hála, K. and Wick, G. (1987) Relationship between the expression of class I and reactivity of chicken thymocytes. *Immunogenet.* 26:150-154.

Sharma, J. M. (1981) Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: Inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens. *Avian Dis.* 25:882-893.

Tilanus, M.G.J., Ginkel, R. V., Engelen, I., Rietveld, F. W. Hepkema, B. G., Zijpp, A.J., Egberts, E. and Blankert, H. (1989) The chicken B - complex in commercial pure lines: comparisson of polymorphisms defined by serotyping and DNA analysis. In: *Recent advances in avian immunology research*. Bhogal, B. S. and Koch G. Eds. Alan R. Liss. New York. pp. 187-196.

FISIOLOGIA DE LA RESPUESTA INMUNE

Hayari, Y., Schauenstein, K. and Globerson, A. (1984) Avian lymphokines, II: Interleukin-1 activity in supernatants of stimulated adherent splenocytes of chickens.

Krömer, G., Schauenstein, K. and Wick, G. (1982) Avian lymphokines: an improved method for chicken IL-2 production and assay. A con-A erythrocyte

complex induces higher T cells proliferation and IL-2 production than does free mitogen. *J. Immunol. Methods* 73:273-281.

Schnetzler, M., Oommen, A., Nowak, J. S. and Franklin, R. M. (1983) Characterization of chicken T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* 13:560-566.

Sharma, J/M., and Okazaki, W. (1981) Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis of antithymocyte serum on effector cells. *Infect. Immunity* 31:1078-1085.

Vainio, O., Veromaa, T., Eerola, E., Toivanen, P. and Ratcliffe M. J. H. (1988) Antigen-presenting cell-T cell interaction in the chicken is MHC class II antigen dependent. *J. Immunol.* 140:2864-2868.

Vainio, O., Ratcliffe, M. J. H. and Leanderson, T. (1986) Chicken T-cell growth factor: use in the generation of long-term cultured T-cell line and biochemical characterization. *Scand. J. Immunol.* 23:135-142.

EL SISTEMA INMUNE SECRETORIO

Davis, P.J, Parry, S.H. and P. Porter. (1987) The role of secretory IgA in anticoccidial immunity in the chicken. *Immunol.* 34:879-888.

Dhoms, J.E. Saif, Y. M. and J. E. Pitts. (1977) Isolation of turkey immunoglobulin-A. *Avian Dis.* 22:151-156.

Goudswaard, J, Noordzij, A. van Dam, R. H, vander Donk J. A. and J. P. Vaerman. (1977) The immunoglobulins of the turkey (*Meliagris gallopavo*) Isolation and characterization of IgG, IgM and IgA in body fluids, eggs and intraocular tissues. *Poultry Sci.* 56:1874-1851.

Higgins, D. A. Shortridge, K. F. and N. G. Pamela. (1987) Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*) II. Antibody response in influenza A virus infections. *Immunol.* 62:499-504.

Leslie, G. A, Stankus, R. P. and L. N. Martin. (1975) Secretory immune system of the fowl. V. The gallbladder: An integral part of the secretory immunological immune system of the fowl. *Intern. Arch. Allergy Applied Immunol.* 51:175-185.

Lim, O. J. and S. K. Maheswaran. (1977) Purification and identification of turkey immunoglobulin-A. *Avian Dis.* 21:675-696.

Pamela, L. K. and D. A. Higgins. (1986) Bile immunoglobulin of the duck (*Anas Platyrhynchos*) I. Preliminary characterization and ontogeny. *Immunol.* 58:323-327.

Rose, M.E, Orlans, E, Payne, A. W. R. and P. Hesketh. (1981) The origin of IgA in the chicken bile: its rapid active transport from blood. *Eur. J. Immunol.* 11:561-564.

Toth, T, Siegel, P. and H. Veit. (1987) Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: Elicitation versus activation. Avian Dis. 31:861-867.

Toth, T. E, Pyle, R. H, Caceci, T, Siegel P. B. and D. Ochs. (1988) Cellular defense of the avian respiratory system: Influx and nonopsonic activity by respiratory phagocytes activated by *Pasteurella multocida*. Infect. Immun. 56:1171-1179.

Watanabe, H. and K. Kobayashi. (1974) Peculiar secretory IgA system identified in chickens. J. Immunol. 113:1405-1409.

LA EIMERIA TENELLA: UN MODELO DE INVESTIGACION INMUNOLOGICA

Bhogal, B. S., Tse H. Y., Jacobson, E. B. and Schmatz, D. M. (1986) Chicken T lymphocyte clones with specificity for *Eimeria tenella*. I. Generation and functional characterization. J. Immunol. 137:3318-3325.

Bhogal, B. S., Nollstadt, K. H., Karkhanis, Y. D., Chmatz, D. M. and Jacobson, E. B. (1988) Anti-Idiotypic antibody with potential use as an *Eimeria tenella* sporozoite antigen surrogate for vaccination of chicken against coccidiosis. Infect. Immunity 56:1113-1119.

Bhogal, B. S., Miller, G. A., Anderson, A. C., Jessee, E. J., Strusberg, R., McCandliss, R. and Strausberg, S. (1989) Vaccination of chickens with recombinant *E. tenella* antigen alone or in combination with a subclinical exposure induces cross protection immunity against coccidiosis. In: Recent Advances in Avian Immunology Research. Bhogal, S. B. and Koch G. Eds. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 131-146.

Carlson, J. H. (1985) Development and application of genetically engineered viral vaccines of poultry. Avian Dis. 30:24-27.

Powell, P. C. (1987) Immune mechanisms in infections of poultry. Vet. Immunol. and Immunopathol. 15:87-113.

LAS AVES COMO MODELO DE INVESTIGACION BASICA Y DE INMUNOPATOLOGIAS CON APLICACION AL HOMBRE.

Ohki, H., Martin, C., Corbel, C., Coltey, M. and N. Le Douarin. (1989) Effect of early embryonic grafting of foreign tissues on the immune response of the host. In: Recent advances in avian immunology research. Bhogal, S.B. and Koch G. Eds. Alan R. Liss, inc. New York. pp.3-17.

Lamoreux, M. L., Guerrety, L. and R. E. Boissy. (1987) Vitiligo. In: Handbook: Animal models of Human disease. Fasc. 16 Ed. Cappen, C. C, Jones, T. C. and

G. Migaki. Registry of Comparative Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C.

Van der Water, J. and M. E. Gershwin. (1986) Scleroderma. In: Handbook : Animal models of human disease. Fasc. 15. Ed. Cappen, C. C, Jones, T. C. and G. Migaki. Registry of Comparative Pathology, Armed forces Institute of Pathology, Washington, D.C.

Wick, G. (1976) Thyroiditis. In: Animal models of human disease. Fasc. 5. Jones, T.C. , Hackel, D.B, and G. Migaki, Eds. Registry of Comparative Pathology, Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C.

U. S. Army, Army of Engineers, Hydrographic Branch, Report No. 1000, 1910.
Washington, D. C.

For the State, Land and Ocean Survey, 1910. Distribution of water in the
vicinity of the mouth of the Columbia River, Oregon, and Washington, U. S.

U. S. Army, Army of Engineers, Hydrographic Branch, Report No. 1000, 1910.
Washington, D. C.

1000

1000