
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

EFEECTO INMUNORREGULADOR DE LA TACTIVINA *IN VITRO* EN EL ENSAYO DE TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS T DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*), A DIFERENTES TEMPERATURAS BAJO CONDICIONES DE ESTRES.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

► IRMA LETICIA TOTSUKA SUTTO ◀

GUADALAJARA, JALISCO. DICIEMBRE 1997



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

C. IRMA LETICIA TOTSUKA SUTTO
PRESENTE.

0326/96

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTO INMUNOREGULADOR DE LA TACTIVINA IN VITRO EN EL ENSAYO DE TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS T DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*). A DIFERENTES TEMPERATURAS BAJO CONDICIONES DE ESTRES , para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis la DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., Abril 30 de 1996
EL DIRECTOR


M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO


OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p. DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA Director de Tesis.- pte.
c.c.p El expediente del alumno.
AEIR/SVM/achm

C.U.C.B.A



**DIV. DE CS.
BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES**

M.enC. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA
DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

P R E S E N T E .

Por medio de la presente, me permito comunicar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante en Biología: IRMA LETICIA TOTSUKA SUTTO, código 084583715 con el título: **“EFECTO INMUNOREGULADOR DE LA TACTIVINA *IN VITRO* EN EL ENSAYO DE TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS T DEL BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*), A DIFERENTES TEMPERATURAS BAJO CONDICIONES DE ESTRES”**, considero que ha quedado satisfactoriamente concluido, por lo que solicito la autorización de impresión y programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular y agradeciendo de antemano la atención que se sirva dar a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Las Agujas, Nextipac, Zap., Jal. a 30 de octubre de 1997.

EL DIRECTOR DE TESIS



DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA

SINODALES

- 1.- **M.enC. ALFONSO ISLAS RODRIGUEZ**
- 2.- **M.enC. ARTURO OROZCO BAROCIO**
- 3.- **M.enC. OSWALDO S. PALACIOS RIVERA**

FIRMA

FIRMA

FIRMA



Soneto a la ciencia

Ciencia ¡Verdadera hija del viejo tiempo, tu arte!

Alteras todas las cosas con tus ojos inquietos.

Edgar Allan Poe (1809-1849)

CUCBA

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS



BIBLIOTECA CENTRAL

Dra. Galina Zaitseva Petrovna

Por su constancia, apoyo, paciencia, tenacidad y amistad, que motivan a la expresión plena de nuestras potencialidades con la enseñanza que es el único camino para lograr el éxito. Gracias por ayudarme a construir mi futuro y hacerme ver el presente, su honestidad es el aval de cada una de sus acciones lo que me enseñó el sendero donde encausar el logro de mis ideales.

Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez

Cuando los problemas y cambios trajeron confusión su confianza, conocimientos y responsabilidad mantuvieron la esperanza de que la meta era tangible. Gracias por otorgarme el arma más noble de la vida, el saber.

Dr. Vitaliy Ya. Arion

Thank you, by having had the privilege of that might teach to me with the knowledge to be able to apply in this work and furthermore might teach to me that there is to be challenged to if same and be proposed put superior and to fight tirelessly to to achieve me.

Ocean. Salvador Velázquez Magaña

Gracias, por haberme enseñado y corregido con su capacidad, amistad y paciencia. Es muy interesante saber que existen maestros que realizan la misión de aportar conocimiento para que la colegiatura generacional avance con excelencia.

Biol. María Luisa Pita López

Por su cooperación, asistencia, capacidad, motivación y transmitirme su experiencia en la técnica para realizar este trabajo, muchas gracias.

Gracias a cada una de las personas que de alguna u otra forma participaron en la realización de este trabajo en la Secretaría de Pesca, Instituto Politécnico Nacional, Laboratorio de Inmunobiología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. En especial a la MenC. Mary Fafutis Morris y al Dr. Rubén López Santiago por su gran apoyo y consejos.

A Dios

Si quisiera abismarme en lo profundo del misterio y empañara mi mente buscando la verdad, se que al fin del abismo te encontrare, sin saber que tú estabas al principio de la misma verdad que fui a buscar.

A la Memoria de mi Padre y con amor a ti Mami

Gracias por darme la vida, contar siempre con un gran apoyo y ser el secreto de mi éxito en el estudio de mis errores y una luz en los caminos difíciles otorgandome día a día horizontes risueños.

A mis Hermanos: Sylvia, Héctor y Noemi

Gracias, por enseñarme que la vida no es algo que se nos da hecho, sino que tenemos que producir las oportunidades para alcanzar el éxito y ser como ustedes forjadores del trabajo, disciplina, responsabilidad, amistad, ayuda y amor a la profesión que se elige. Por quererme y apoyarme, siempre mi camino es merecer el jarrón azul.

A mis amigos

Conozco mucha gente en mi paso por la vida, pero sólo unos cuantos me dejan una impresión duradera en el espíritu y el corazón. En esas personas pienso a menudo, y ellas siempre serán importantes para mí, pues me brindan la verdadera amistad. Gracias por el apoyo y comprensión en el transcurso de la realización de mi tesis.

A Totori y Kingoo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología perteneciente al Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Galina Zaitseva Petrovna y la asesoría del M. en C. Alfonso E. Islas Rodríguez.

**EFFECTO INMUNORREGULADOR DE LA TACTIVINA *IN VITRO* EN EL
ENSAYO DE TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS T DEL
BAGRE DE CANAL (*Ictalurus punctatus*), A DIFERENTES TEMPERATURAS
BAJO CONDICIONES DE ESTRES.**

I N D I C E

		PAGINA
II	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	2
III	ANTECEDENTES	5
IV	HIPOTESIS	41
V	OBJETIVO GENERAL	42
VI	OBJETIVOS PARTICULARES	43
VII	MATERIAL Y METODOS	44
VIII	RESULTADOS	49
IX	DISCUSION	64
X	CONCLUSIONES	68
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
XII	ABREVIATURAS	72

IDICE DE CUADROS, FIGURAS Y TABLAS

CUADRO		PAGINA
A	Taxonomía del Bagre de Canal.	6
B	Requerimientos nutricionales del bagre.	8
C	Etapas de desarrollo y crecimiento del bagre de canal.	9
<hr/>		
FIGURA		PAGINA
1	Evolución de los órganos y células del sistema inmune.	18
2	Corte transversal del Timo.	19
3	Corte histológico del Bazo.	20
4	Posibles mecanismos de acción de los péptidos tímicos en los procesos celulares bioquímicos.	29
5	Ciclo celular del linfocito T.	35
6	Eventos bioquímicos en la activación de linfocitos por mitógenos o antígenos.	40
7	Promedio de los I.E. de linfoproliferación del bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>), estimulados con mitógenos (PHA, ConA).	54
8	Promedio de los I.E. de transformación blastoide de los linfocitos del bagre de canal, estimulados con mitógenos independientemente de la dosis, a diferentes temperaturas.	55
9	Promedio de los I.E. de linfoproliferación del bagre de canal, estimulados con PHA 100µg/ml y ConA 100µg/ml a diferentes temperaturas.	55
10 a 15	Niveles de significancia estadística entre los I.E. de transformación blastoide de linfocitos esplénicos del bagre de canal estimulados con PHA 100 µg/ml incubados a diferentes temperaturas.	56
16 a 22	I.E. de los linfocitos del bagre de canal, estimulados con PHA 100 µg/ml y tratados previamente con Tactivina 20 µg/ml a temperatura de 27° C en condición normal y estrés.	59
<hr/>		
TABLA		PAGINA
1, 2, 3 y 4	I.E. de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos de bagre estimulados con PHA y ConA en dosis logarítmica, a una temperatura de 32, 27, 20 y 15° C.	51
5	Promedio de cuentas por minuto en ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos del bagre de canal estimulados con PHA y ConA.	53
6, 7 y 8	I.E. de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos de bagre estimulados con PHA 100 µg/ml a una temperatura de 27° C en presencia de Tactivina en condición normal y estrés.	57

RESUMEN

La Tactivina es un extracto purificado del timo constituido por 16 fracciones de polipéptidos con un peso molecular de 1.2 a 6 kDa con actividad inmunorreguladora, se utiliza en los vertebrados superiores para el tratamiento de diferentes tipos de inmunodeficiencia, incluyendo la provocada por el estrés, el cual es un factor negativo principal en la producción de los peces.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la Tactivina sobre las células incompetentes *in vitro* en el bage de canal (*Ictalurus punctatus*), para lo cual fue utilizado el ensayo de linfoproliferación para caracterizar el estado funcional de la inmunidad celular, en los linfocitos esplénicos del bage estresado mediante variables de temperatura fueron cultivados bajo estímulo mitogénico de fitohemaglutinina (PHA) en presencia de diferentes dosis de Tactivina.

Se determinó que la temperatura óptima de cultivo de linfocitos de bage de canal es de 27° C y la dosis de PHA más adecuada fue de 100 µg/ml, se observó que no hay cambio significativo en el Índice de Estimulación (I.E.) de los linfocitos en los bagres en condiciones normales tratados con Tactivina y hay un incremento significativo en los bagres desafiados con estrés. Este trabajo demuestra que la Tactivina no modifica los parámetros normales en el bage de canal, sin embargo incrementa la respuesta inmune celular alterada por el estrés permitiendo así su uso como factor antiestresante en la acuicultura.

INTRODUCCION

Actualmente el desarrollo de la acuicultura está adquiriendo una importancia relevante, principalmente por que contribuye a la creciente demanda de productos alimenticios de gran valor nutricional, esto representa una alternativa importante en nuestro país, puesto que los productos de origen animal de especies tradicionales se tornan cada día más inalcanzables para gran parte de la población. Para el mejor desarrollo de una actividad productiva, como lo es la acuicultura, es imperativo que no sólo los recursos naturales se encuentren en suficiente cantidad y calidad, sino que además exista un ambiente de transformación de recursos.

En la República mexicana se dispone de 2.8 millones de hectáreas de cuerpos de agua dulce y salobre factibles para implantar y desarrollar programas de producción acuicola. Para la realización de este propósito se elaboraron mediante un análisis teórico-práctico, técnicas para implementar cultivos innovadores en el área. (Ojeda y Rodríguez, 1989)

En el presente estudio se elige trabajar con bagre (*Ictalurus punctatus*), por su fácil manejo, su gran adaptación a diferentes ambientes y excelente crecimiento en un tiempo relativamente corto a una talla comercial. El bagre ha significado sustento de actividades deportivo-recreativas en México y en otros países que se han beneficiado con su introducción en reservorios de usos múltiples. Todo esto, conjuntado al gran potencial alimenticio que de este se puede obtener, hacen del bagre un pez que brinda un recurso de alta calidad en la dieta del hombre, colocándose así, como una especie de vanguardia en la producción. Sin embargo, últimamente ha disminuido considerablemente su rendimiento, principalmente debido a enfermedades las cuales ocasionan una limitante en los cultivos, causando gran pérdida económica, siendo también de importancia en lo que respecta a salud pública, pues en algunas ocasiones, los peces albergan fases infectivas para el hombre como es el caso de algunas helmintiasis, puesto que, en algunos lugares acostumbran a ingerir pescado crudo, o a medio cocer debido a sus hábitos culinarios y culturales. (Secretaría de Pesca, 1988) De acuerdo a la mortalidad que se presenta en las diferentes etapas de desarrollo en el bagre (alvinaje 10%, crías 15% y juveniles 15%) y

la morbilidad causada principalmente por bacterias saprofitas y oportunistas facultativas (Gómez, 1993) surgió el interés en el estudio inmunológico del pez. Las investigaciones realizadas en el campo de la fisiología, nutrición, genética y patología, conjuntados con la inmunología crearán medidas inmunoproliféricas recuperando la economía del pez, dando un sistema de producción más efectivo para el desarrollo de la acuicultura.

El estudio de la inmunidad contribuye al conocimiento de los mecanismos de defensa que le permiten al pez protegerse, manteniendo su homeostasis y confiriendo resistencia a los agentes agresores que se encuentran en el medio ambiente. En Estados Unidos y Canadá, (Rijkers, 1981) donde se ha aplicado el conocimiento sobre la inmunidad del pez, se cuenta con un avanzado desarrollo en su producción, dando como resultado una mejora y expansión de sus poblaciones de peces. (Bardach y Ryther, 1982)

Los peces como los anfibios y reptiles, son animales poiquiloterms (del griego: *poikilos* - que cambia, *thermos* - calor) o ectoterms (del griego: *ektos* - por fuera, *thermos* - calor) su temperatura corporal está en función de las variaciones del medio, se les considera animales de sangre fría, a diferencia de los mamíferos y las aves que son homeotérmicos (del griego: *homos* - mismo, *thermos* - calor) o endoterms (del griego: *endon* - dentro, en el interior, *thermos* - calor) por lo que su temperatura se mantiene constante y son llamados animales de sangre caliente. (Hill, 1980)

Las reacciones fisiológicas obedecen a la ley de Q10 que dice que una elevación térmica de 10°C entraña la duplicación de la cinética de las reacciones enzimáticas, así como de los fenómenos fisiológicos; por lo que un pez que permanezca en los límites térmicos correspondientes a su especie, desarrolla sus funciones con normalidad aunque no en forma óptima. (Kinkelin, Michel y Grittino, 1991) Los cambios de temperatura ambiente de ligeros a moderados se transmiten rápidamente a través del cuerpo del pez por medio de los capilares de la piel y branquias. (Lagler, Bardach, Miller y Passino, 1990)

Los peces son animales ectotérmicos, por lo que su crecimiento, tasas metabólicas, reproducción, respuestas inflamatoria e inmune varían de acuerdo con la temperatura del agua. En el cultivo del bagre se pueden observar enfermedades bacterianas, parasitarias, nutricionales y genéticas, relacionadas con las cualidades físicas y químicas del ambiente: la temperatura, pH y salinidad. (Kinkelin et al., 1991)

La Respuesta Inmune Celular (RIC) en vertebrados poiquiloterms (peces, anfibios y reptiles), se considera estrechamente relacionada con la temperatura, por lo que se deduce la existencia de una zona de temperatura óptima para la proliferación de linfocitos T del bagre de canal. (Bly y Clem, 1992)

En los últimos años se ha demostrado que existe una combinación bidireccional entre el Sistema Inmune (SI) y el Sistema Nervioso Central (SNC), cuando un organismo es

estimulado por los factores de agresión presentes en el ambiente, reacciona desencadenando un conjunto de respuestas denominadas estrés. Esto se ha investigado en modelos animales (mamíferos), en los cuales se ha observado que el estrés reduce la respuesta inmune, por lo que se infiere que hay gran susceptibilidad a la infección; las manipulaciones tales como captura, selección, transporte e influencia de temperatura en los peces son fuente de estrés, el cual tiene efecto directo en la morbilidad y mortalidad, ya que habrá deprimido la inmunidad conduciendo a la manifestación de infecciones por microorganismos presentes en el agua y en otros peces. (Schäperclaus, Kulow y Scherecrenbach, 1992)

La influencia del estrés en la respuesta inmune en los peces no ha sido medida por ensayos de linfoproliferación, esta dará como resultado el conocimiento fisiológico cualitativo del linfocito.

En el timo se encuentran sustancias inmunotrópicas, a través de las cuales realiza su función inmunorreguladora, la diferenciación y maduración de las células que surgen de la médula ósea, que termina como linfocito T maduro, son reguladas por péptidos descritos como hormonas tímicas. Actualmente existen sustancias con propiedades inmunomoduladoras, una de ellas es la Tactivina (Institute for Physico-Chemical Medicine of USSR Ministry of Public Health, Moscow Nos 784052 y 997298, Great Britain No. 2086392, France No. 2492663 y USA No. 4377511), la cual esta compuesta por polipéptidos de origen tímico y se utiliza en el tratamiento de inmunodeficiencias. (Arion, 1989)

Este es un estudio en la frontera del conocimiento de la Inmunología Comparada, puesto que los peces son el primer grupo de animales en quienes se les caracteriza la presencia de un SI, ya que los peces están constituidos como los demás vertebrados con una inmunidad específica celular y humoral la cual se advierte más evolucionada en los teleósteos (bagre) que en los ciclóstomos y peces cartilagosos.

La importancia de este trabajo radica en aportar herramientas que permitan tomar las medidas de prevención y diagnóstico, favoreciendo así, la posibilidad de disminuir o evitar pérdidas por las enfermedades infecciosas en las poblaciones de bagre de canal, las cuales son cultivadas en las granjas acuícolas.

ANTECEDENTES

Dentro de las especies dulceacuicolas de mayor importancia que se cultivan en México desde 1976, se encuentra el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), los primeros ensayos de producción comercial se iniciaron por un consorcio particular en Rosario, Sinaloa y Miguel Alemán, Tamaulipas; actualmente existen más de 50 granjas dedicadas al cultivo de ésta especie, localizadas principalmente en la zona norte y centro del país, donde el consumo es muy apreciado. En el sureste de Estados Unidos se ha cultivado en forma comercial desde hace más de 50 años. (Ojeda y Rodríguez, 1989)

GENERALIDADES

La clase Osteichthyes de los vertebrados, la cual incluye a los peces óseos, surge por evolución de los placodermos ancestrales hace aproximadamente 425 millones de años durante el período Devónico. De esta clase aparecieron tres subclases, una de ellas incluye a peces de aletas con radios Actinoptergios constituida por 24 órdenes ya desaparecidos con 35 sobrevivientes, incluyendo más de 400 familias y presenta tres órdenes o grupos: Condrósteos, Holósteos y Teleósteos; éste último grupo fue desviado en forma independiente a lo largo de diferentes líneas hace 200 millones de años en el período Triásico de la era Mesozoica, representa más del 95% de todos los peces vivos, incluyendo el bagre de canal. Dentro de este grupo existen aproximadamente 20,000 especies consideradas como los peces óseos superiores, o más evolucionados. (Turner, 1994) Los peces teleósteos tienen gran importancia económica, debido a la captura de más de 40 millones de toneladas métricas cada año como alimento y obtención de fertilizantes y aceites. (Bardach y Ryther, 1982) El detalle de la taxonomía del bagre de canal se refiere en el cuadro A.

TAXONOMIA

Bagre de canal ó pez gato

REINO	Animal	ORDEN	Teleósteos
PHYLUM	Chordata	SURORDEN	Siluroidei ó Silariformes
SUBPHYLUM	Gnastomata	FAMILIA	Ictaluridae
CLASE	Osteichthyes	GENERO	<i>Ictalurus</i>
SUBCLASE	Actinopterygii	ESPECIE	<i>punctatus</i>

CUADRO A

MORFOLOGIA Y FISILOGIA

El bagre de canal se identifica por poseer ocho bárbelas quimiotáctiles (el labio inferior posee dos barbas negras y en el ángulo de la boca otros cuatro), el labio inferior es papiloso, posee dientes viliformes, su cabeza es grande y gruesa, su cuerpo aplanado dorsoventralmente, carece por completo de escamas; la primera espina de su aleta dorsal anterior y la de sus aletas pectorales son muy duras y gruesas, la aleta anal con un borde redondeado compuesto de 24 a 29 radios, la aleta caudal profundamente furcada y la aleta dorsal esta colocada por delante de la mitad del cuerpo. En la parte dorsal del cuerpo presenta una coloración que va del azul al oliva metálica con los costados plateados y puntos oscuros. (Secretaría de Pesca, 1988)

Hablando en términos biológicos el bagre está compuesto de diez sistemas formados por órganos que trabajan en coordinación, entre los más importantes es el respiratorio llevado a cabo por medio de la laminilla branquial, compuesto por un repliegue tegumentario donde se efectúan los cambios gaseosos por difusión simple, los gases como el oxígeno y el gas carbónico se difunden en sentido inverso el uno del otro; estas transferencias se realizan por el movimiento del agua aspirada, posteriormente comprimida por el trabajo buco-opercular y que va a contracorriente de la circulación sanguínea intralaminar. La respiración branquial puede extraer del agua entre el 50 y 80 % del oxígeno disuelto según la especie, en el bagre no sobrepasa el 69 %. (Lagler et al., 1990) En los peces, el sistema circulatorio es cerrado, mediante un sistema tubular de corazón y vasos, el corazón es una bomba con válvulas que impulsan la sangre hacia las branquias para su aireación con apoyo de los arcos aórticos, el volumen sanguíneo es equivalente del 1.5 a 3.5 % del peso del cuerpo. El sistema linfático del bagre deriva de la parte venosa, en los teleósteos los vasos linfáticos poseen una disposición bien definida comparable a los vertebrados superiores. La sangre en los peces, al igual que en los otros vertebrados consta de dos partes: una fluida y otra sólida, (Kinkelin et al., 1991) la primera corresponde al plasma y la segunda a las células sanguíneas rojas (eritrocitos) y blancas (linfocitos, leucocitos), las cuales están suspendidas y son transportadas. Los peces tienen bajos niveles de proteínas en la

sangre comparado con los vertebrados superiores, las principales son: la albúmina (para el control de la presión osmótica), lipoproteína, globulina, yoduroforino (único en los peces, que liga al yodo inorgánico), fibrinógeno (elemento de coagulación); cabe mencionar que los peces tienen un período de coagulación corto. (Lagler et al., 1990) En la sangre de todos los peces, el número de glóbulos rojos queda comprendido entre 20,000 a 3'000,000 por mm^3 de sangre, en el bagre de canal, el número de eritrocitos reportados es de 1'300,000 por mm^3 de sangre, los eritrocitos son nucleados y de color amarillo rojizo a excepción de tres especies pequeñas del Antártico que tienen un metabolismo bajo, adaptado al frío, en estado de madurez tienen una forma oval, en promedio el diámetro es de 7 micras (en humanos el diámetro del eritrocito es de 7.9 micras). (Blazer, Bennett y Wolke, 1984) Las células blancas o leucocitos son de forma oval a esferoide, tienen un promedio de 10 micras de diámetro y varía el número de glóbulos blancos de acuerdo a la especie de pez, por lo general comprenden entre 20,000 y 150,000 por mm^3 , según su hábitat. (Lagler et al., 1990) los granulocitos forman parte entre el 4 y 40 % de todos los corpúsculos blancos, los leucocitos agranulares son los componentes celulares blancos más numerosos en la sangre de los peces, los monocitos tienen una función macrófaga, los linfocitos se diferencian en dos grandes poblaciones, una dedicada a la producción de anticuerpos y la otra a la inmunidad celular, los trombocitos equivalen a la mitad de todos los leucocitos del pez. (Bogner y Ellis, 1977) En los vertebrados de sangre caliente la formación de las células sanguíneas se realiza principalmente en la médula ósea y otros órganos linfoides primarios como timo y bolsa de fabricio o sus equivalentes; existen otros órganos que participan en la formación de células sanguíneas (hematopoyesis): como bazo, riñón anterior e hígado en peces y anfibios. (Rijkers, 1981) El hígado es el órgano más grande del cuerpo, funciona primordialmente como una fábrica y almacén; los alimentos son degradados a sustancias más simples; una de sus funciones consiste en reunir de nuevo estas sustancias de una forma adecuada para su almacenamiento. Los azúcares, por ejemplo, se unen originando un tipo de almidón (glucógeno), el cual es almacenado hasta el momento en que se necesite. La vejiga natatoria, una derivación evolutiva de los pulmones, es adyacente al esófago y anteriormente estaba conectada a éste por un conducto, sirve principalmente como medio para ajustar la flotabilidad permitiendo al pez permanecer a una determinada profundidad sin ascender o sumergirse, el gas entra en la vejiga a partir de una glándula gaseosa y se elimina por absorción en la corriente sanguínea. (Kinkelin et al., 1991)

El SNC, con un cerebro anterior reducido a los lóbulos olfatorios, presenta las subdivisiones clásicas de los vertebrados, puede estar en estrecha relación con las alteraciones patológicas por intervención del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la reacción de alarma llamada estrés, susceptible de ser perturbada. (Schäperclaus et al., 1992)

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Esta especie neártica nativa se distribuye desde la región de las grandes planicies de Canadá, zona norte de Estados Unidos de Norteamérica hasta la región noreste de México. En los últimos años se distribuye en diversos países asiáticos y centroamericanos.

Se cultiva principalmente al sur de Estado Unidos; en México tiene una distribución en Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Nuevo León, Querétaro y Jalisco. (Ojeda y Rodríguez, 1989)

HABITAT

Se encuentra en las presas, lagos o ríos caudalosos con aguas claras o turbias; con fondos de roca, grava y arena pueden vivir bajo troncos, o pozas profundas. Se caracteriza por ser una especie de hábitos nocturnos, por lo que en el día nada en el fondo y en la noche sale a alimentarse en aguas abiertas. (Secretaría de Pesca, 1988)

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

El bagre de canal es omnívoro típico, que ingiere cualquier material vegetal o animal disponible incluyendo peces muertos y otros animales; análisis estomacales han revelado que esta constituido en promedio de un 46% de restos de peces, 18% de peces forrajeros, 13% de restos de insectos, 8% de materia orgánica, 6% de algas, 4% de restos de plantas superiores, 0.4% de entoproctos y 0.3 % de moluscos. (Bardach y Ryther, 1982) Se puede apreciar los requerimientos nutricionales en los cultivos de bagre en el cuadro B.

NUTRIENTES	DIETA P/CRECIMIENTO OPTIMO
PROTEINA	28 - 39 %
CARBOHIDRATO	10 - 20 %
GRASA CRUDA	4 - 8 %
LIPIDOS	5 - 10 %
HARINA DE PESCADO	8 %
FIBRA	8 - 20 %
MINERALES	2 - 4 %
CALCIO	1 %
VITAMINAS	4 %

CUADRO B



En los cultivos de peces se requiere de energía tanto para la conversión de la proteína en tejido muscular propio, como para la excreción del exceso de proteína. Los requerimientos de aminoácidos esenciales de los peces tienen más importancia que la necesidad de proteína total, que se adicionan en el alimento. Se han detectado 10 aminoácidos importantes para el bagre: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina. La cantidad de proteína en el alimento del bagre es el ingrediente más caro en la elaboración de la dieta. (Heinz y Reichenbach, 1982)

CICLO DE VIDA

El bagre alcanza la madurez sexual a una talla de 20 cm. y con un peso aproximado de 350 g; sin embargo, la plenitud de su madurez la logran en un peso de 1.5-4.5 Kg. y una edad que va de 2 a 4 años. Existe dimorfismo sexual, el macho presenta una papila genital protuberante y alargada con una coloración de piel más oscura que en las hembras. El bagre se reproduce durante los meses de primavera-verano (de abril a julio), el inicio de la reproducción está relacionada con la elevación de la temperatura del agua. (Ojeda y Rodríguez, 1989) La fecundación es externa y la fecundidad variable, está en función del peso y la talla, una hembra de 397 gramos y 324 mm puede contener hasta 3,000 óvulos maduros, se ha reportado de un peso de 1,814 gramos con una producción de más de 10,500 óvulos maduros. La reproducción se efectúa una sola al año, y es de carácter monogámico. (Secretaría de Pesca, 1988)

En el momento en que la temperatura oscila entre 21-23°C, es cuando la reproducción se inicia, la hembra desova en el nido y el macho fecunda, protege y airea los huevecillos (el conjunto de óvulos fecundados, o huevecillos se le denomina "freza") con sus aletas pectorales con el objeto de oxigenarlos. La freza debe de tener una temperatura de 25 a 29° C, siendo la ideal de 27° C, (Bardach y Ryther, 1982) ya que de lo contrario la freza se malforma, por lo que este factor es un requerimiento indispensable para el desarrollo embrionario. Los bagres de vida libre, tienen un rango de vida de 4 a 5 años y solo rara vez llegan a los 8 ó 9 años. (Ojeda y Rodríguez, 1989) El desarrollo y crecimiento del bagre en las diferentes etapas se describe en el cuadro C.

HUEVO	ALEVIN	CRÍAS	COMERCIAL	JUVENIL	ADULTO
7 a 8 días	20 - 25 días	2 a 3 meses	6 a 7 meses	1 a 1 ½ años	2 a 4 años
2,000 -3,000 huevecillos por cada 454 g de peso	talla 2.5-4 cm peso 1.0 g	talla 12 cm peso 10 g	talla (mínima): 20-30 cm peso 250-350 g	talla 30-40 cm peso 400 a 1,500 g	talla 40 a 100 cm peso 2 a 4 Kg

TEMPERATURA

A temperaturas menores de 15° C el crecimiento del bagre es muy lento, de 21° C a 29° C crece más rápido.

La temperatura es un factor de suma importancia en el crecimiento y alimentación de esta especie. Los cambios bruscos pueden producir un "choque" que, en la mayoría de los casos, ocasionan la muerte del pez. Los bagres pueden resistir un cambio de temperatura de 3° C, si el agua es atemperada después de unos minutos, pero requiere por lo menos, una hora para ajustarse a variaciones de temperatura. A medida que la temperatura aumenta, disminuye el oxígeno disuelto en el agua, ello afecta negativamente al pez. (Bly y Clem, 1992)

La temperatura se considera óptima en invierno por debajo de los 17° C y en el período primavera-verano entre 24-30° C. (Hill, 1980)

pH

El intervalo óptimo que se requiere para cultivo es de 7.5-8, en medio natural se encuentra en rangos de 7-8. Una práctica muy utilizada para mantener un pH adecuado consiste en la adición de cal a los estanques, lo que provoca un aumento en la alcalinidad, la cual se cuantifica como dureza total, encontrándose dentro del intervalo de 20 y 150 p.p.m. (Secretaría de Pesca, 1988)

El cambio de pH tiene efecto directo de irritación, incluso corrosión, Froom en 1980 estudió que en un medio ácido conduce frecuentemente a afecciones branquiales y como consecuencia al estrés. La acción indirecta del pH actúa en la toxicidad: con un pH bajos elevan la toxicidad de los metales y de los nitritos; a la inversa, un pH elevado aumenta el amoníaco. En el bagre, un incremento en la concentración iónica del hidrógeno (H), o sea, el descenso en los valores de la escala acidez-alcalinidad de pH tiene efectos similares para un incremento en la tensión del dióxido de carbono (CO₂) en la capacidad de acarreo de oxígeno de la hemoglobina, por lo que no se puede saturar por completo la sangre, cuando la temperatura del agua es elevada hay un aumento en la respiración del pez, debido a que los tejidos demandan más oxígeno, esto puede conducir a la mortalidad de los peces por asfixia. (Lagler et al., 1990)

DENSIDAD DE POBLACION

La densidad como función del tiempo, volumen o espacio, constituye un parámetro básico de la población, por lo tanto, la densidad corresponde al número o masa de organismos por unidad de volumen de un estanque. Las densidades relativas interpretadas en términos de cantidad y calidad, reflejan características de la dinámica de población y comunidad, cuyo porcentaje estimado como deseable puede variar en cada reservorio o región, y dependerán de los objetivos específicos del manejo del bagre de canal. Se ha observado que muchos aspectos del comportamiento de los peces y de su fisiología son dependientes de la densidad. La densidad de población es una función de la natalidad contra la mortalidad, si la natalidad actual es superior a la mortalidad real, la población aumenta; sin embargo, si las dos son iguales, la población se mantiene estacionaria, donde la mortalidad real excede a la natalidad real, la población merma. La densidad estándar de cultivo intensivos en granjas para peces de 150 g es de 50 a 70 peces por metro cúbico o 7 a 10 Kg/m³. En las granjas de cultivo semi-intensivo la cantidad de peces es de 20 a 30 por metro cúbico y en las granjas rurales es de 10 a 15 peces por metro cúbico. Las granjas en las cuales trabajamos en el estado de Jalisco son de tipo rural. Para la producción de crías se introducen densidades muy altas que van siendo reducidas periódicamente al declinar o cesar el crecimiento de las crías, por lo que el porcentaje de alimento suministrado disminuirá conforme se vaya incrementando el tamaño y se vaya disminuyendo la temperatura del agua. La mayoría de los bagres se produce en estanques cuyo tamaño oscila entre 1 y 10 hectáreas, para su óptimo desarrollo la cría de bagre de canal es sometido a diferentes densidades en un período de 120 a 150 días. El aumento de la densidad de población es un factor que causa estrés en el bagre de canal y afecta directamente en el estado de condición de la población de los peces incrementando las alteraciones patológicas, la disponibilidad de alimento y cambios bruscos en los factores fisicoquímico del medio.

CONCEPTOS BASICOS DE INMUNOLOGIA

El SI está formado por una compleja red estructural de células y moléculas especializadas con diferentes funciones biológicas distribuidas por todo el organismo. La característica distintiva de este sistema es la capacidad de reconocimiento específico de fragmentos moleculares, que conlleva al establecimiento de interacciones constantes entre sus componentes con los distintos sistemas que forman el organismo y con los posibles elementos extraños que pueden penetrar en el individuo. (Golub, 1987) Esta capacidad de reconocimiento entre lo propio y lo no propio, con la subsiguiente activación celular y desarrollo de los mecanismos efectores, le concede al SI una función relevante entre los mecanismos de defensa del organismo frente a las infecciones y neoplasias. (Benjamini, Sunkhire y Leskowitz, 1996) El componente celular del SI está constituido por los linfocitos y las células accesorias. Los linfocitos se clasifican en T, B y en las denominadas células citotóxicas espontáneas; entre las células accesorias que están implicadas en la activación de los linfocitos se incluyen: los macrófagos, células denticricas, de Langerhans, de Kupffer, etc. La base molecular está formada por el sistema de complemento, las inmunoglobulinas, las linfocinas y monocinas. (Tizard, 1989)

La activación de los componentes celulares del SI está estrechamente relacionada con un grupo de moléculas expresadas en la membrana citoplasmática de las células, conocidas genéricamente como sistema ó complejo principal de histocompatibilidad que son específicas de cada individuo y es responsable del rechazo a injertos. (Stites, Stobo y Wells, 1988)

La inmunidad es un estado de resistencia a agentes infecciosos. Hay dos formas de clasificación: resistencia o inmunidad natural o innata e inmunidad adaptativa. La *inmunidad natural o innata* es inespecífica y los organismos la poseen de manera innata para eliminar sustancias extrañas (antígenos), aun cuando nunca antes hubieran estado expuesto a ellos. Entre los mecanismos innatos de defensa contra invasores extraños se cuenta; las barreras tegumentarias (piel, mucosas), procesos fagocíticos inespecíficos, el complemento, factores humorales y las células de origen inflamatorio. La inmunidad innata se refiere al tipo de resistencia que cada individuo tiene en virtud de su especie, raza, sexo u otros factores asociados con la resistencia controlada por mecanismos genéticos. La *inmunidad adquirida* radica en el reconocimiento específico de numerosos agentes invasores, la síntesis rápida de productos inmunes cuando el organismo tiene contacto con dichos agentes, el envío eficaz de los productos inmunes al sitio de la infección, la diversidad de mecanismos efectores de defensa para combatir agentes infecciosos con diferentes propiedades, los mecanismos de defensa que actúan específicamente contra el agente invasor, no contra el huésped, y el mecanismo de desactivación una vez que se elimina al agente agresor. Se dice que la inmunidad

es adquirida en forma activa cuando la respuesta inmune es inducida por una infección clínica o subclínica; por la inyección deliberada con fines terapéuticos de microorganismos vivos, muertos o de extractos antigénicos (vacunas); por la absorción de sus productos (toxinas); o por material antigénico derivado de éstos (toxoides). Este tipo de respuesta se desarrolla con lentitud, en días o semanas, pero tiene la gran ventaja de persistir por largo tiempo, debido a que sus células tienen memoria inmunológica contra ese antígeno. La inmunidad pasiva puede adquirirse por medios naturales o artificiales, por medios naturales se refiere al paso transplacentario de anticuerpos de la madre a su feto durante la última parte del embarazo. Esta inmunidad se basa en forma casi exclusiva en la inmunoglobulina G (IgG). La inmunidad pasiva artificial se refiere a la inyección de anticuerpos producidos por otro individuo. La inmunización de este tipo se refiere a la inyección de suero hiperinmune, γ -globulina concentrada o suero ordinario. Otra forma de inmunidad pasiva consiste en el uso de monocinas y linfocinas, sobre todo en personas con inmunodeficiencia relacionada con linfocitos T. (Barrete, 1990)

LINFOCITOS

La cantidad de linfocitos en un adulto humano es de 10^{12} , y el conjunto del tejido linfoide es del 1-2% del peso corporal total.

Los linfocitos B se desarrollan a partir de células madre que se originan en la médula ósea, presentan en su membrana citoplasmática inmunoglobulinas de superficie, que constituyen un receptor antigénico; después de la activación y maduración inducida por el antígeno, los linfocitos B se diferencian hacia células plasmáticas con características morfológicas definidas y con la capacidad de secreción de inmunoglobulinas. (Barrete, 1990)

Los linfocitos T se diferencian en el timo a partir de células progenitoras que llegan por la circulación sanguínea del hígado fetal o de la médula ósea, se clasifican en diferentes subclases de acuerdo a su función: linfocitos T cooperadores, T citotóxicos, T supresores y asesinos naturales ó NKs (por sus siglas en inglés). Los linfocitos T presentan en su membrana citoplasmática proteínas con diferente estructura y función que permiten su identificación y caracterización fenotípica. (Abbas, Licntman y Pober, 1994) algunas de estas moléculas están implicadas en los procesos de reconocimiento específico del antígeno, en la activación y adherencia celular, entre estas moléculas se incluye al receptor antigénico de los linfocitos T que está constituido por el heterodímero alfa-beta o el gamma-delta, unido por enlaces no covalentes al complejo molecular monomórfico o constante CD3. Las moléculas del receptor alfa-beta o gamma-delta están implicadas en el reconocimiento y unión al antígeno específico, el complejo molecular CD3 constituye el mecanismo de transducción de esta interacción hacia el interior del linfocito T. Las

cadenas alfa, beta, gamma y delta de los receptores antigénicos de las células T son proteínas en cuya secuencia de aminoácidos se identifica una región constante, común para cada una de ellas y variable propia de cada uno de los distintos clones de linfocitos T diferente a todos los demás, lo que denota a estas moléculas es su carácter. La síntesis de estos receptores es el resultado del reordenamiento de distintos segmentos génicos,^(Golub, 1987) cuando un linfocito entra en contacto con un antígeno al que es capaz de reconocer, sufre ciertos cambios que implican proliferación por mitosis para producir un gran número de células hijas destinadas a responder exclusivamente a ese antígeno.^(Barrete, 1990)

La RIC está integrada por mecanismos mediados por las células para la eliminación de antígenos extraños, las células principales de la RIC son los linfocitos T, los cuales se originan y se maduran en el timo, -órgano principal del SI en todos los vertebrados-. El timo se origina en una evaginación epitelial entodérmica de la tercera y cuarta bolsas branquiales, es el primer órgano linfoide en la etapa embrionaria. está formado por dos lóbulos de células epiteliales agrupadas en forma laxa, cada uno de los cuales está cubierto por tejido conectivo, situado en el mediastino anterior y superior, por delante de los vasos que salen del corazón.^(Roitt y Delves, 1992) El timo en el hombre representa un 0.8% del peso al nacer a la edad de los 10-15 años alcanza su peso máximo de 30 a 40 gramos, las células linfoides de la corteza van desapareciendo gradualmente y finalmente las de la médula; por último, el estroma tímico involuciona, siendo sustituido en su mayor parte por células adiposas.^(Alvarez y García, 1992)

La principal función del timo consiste en educar a las células madre de la línea T hasta que alcanzan su madurez y modificar la función inmunitaria.^(Tizard, 1989)

INMUNOLOGÍA DE LOS PECES

El SI de los organismos menos evolucionado como los peces tiene fundamentos semejantes a los animales de sangre caliente; en los teleósteos a los cuales pertenece el bagre de canal como se mencionó, su SI es más desarrollado que en los ciclóstomos y peces cartilagosos.^(Sima y Vetvicka, 1993)

Los peces poseen la piel bien adaptada para los desplazamientos en el medio acuático y aísla al animal de microorganismos que habitan en el agua, además tiene una capa de mucosa la cual es una barrera tisular. La epidermis es menos espesa que en los vertebrados superiores y no está queratinizada, tiene un poder de cicatrización y de regeneración muy superior al de los mamíferos, las aletas seccionadas crecen parcialmente.^(Sakai, 1992)

Algunos estudios realizados en 1971 por Lukjanenko en los peces demuestran que los factores defensivos humorales inespecíficos existentes en los líquidos corporales y

tisulares (mucus, esperma, huevos, suero) están en forma de lisozima y en los factores celulares son una barrera defensiva contra virus, bacterias y hongos, con las especies primitivas de gonoideos resultan efectivos. En 1969, Kudrjaceva y col. investigó que la elevada tasa de leucocitos en la sangre periférica de los teleósteos (20 000 a 52 000 leucocitos/mm³), tienen una proporción de linfocitos de 70-80% de la tasa leucocitaria total, lo que conlleva a una buena actividad de inmunidad celular en los peces; (Miller y Clem, 1984) éstos tienen inmunidad natural o innata y adaptativa, la inmunidad natural comporta efectores humorales (el complemento y sustancias séricas con propiedades aglutinantes, hemolizantes, precipitantes o neutralizantes), celulares y tisulares como piel y mucosas. (Kinkelin et al., 1991)

Se han descrito en los peces ciertas sustancias a las que se ha dado el nombre de anticuerpos "naturales" o no específicos, en contraposición a los anticuerpos específicos que reaccionan con el antígeno el cual estimula su producción. Estos anticuerpos "naturales" poseen una amplia gama de actividad, se han identificado por su movilidad electroforética, en la fracción gammaglobulina; y por la capacidad de activar el complemento. (Roberts, 1989)

Las propiedades básicas del complemento de los mamíferos (termolabilidad, requerimientos de Ca²⁺ y de Mg²⁺) las comparten los peces. El sistema del complemento es un complejo de enzimas formado por once fracciones proteicas independientes que están presentes en el plasma de los peces. El complemento de los mamíferos se inactiva a temperaturas altas (54°C durante 20 minutos), mientras que en los peces es más sensible al calor, se inactiva a 45°C, y a temperaturas bajas la actividad del complemento subsiste a 4°C. (Roberts, 1989) Es probable que el complemento de los peces muestren otras características bioquímicas diferentes, se ha comprobado que las inmunoglobulinas de los peces al formar complejos antígeno-anticuerpo no consiguen activar el complemento de mamíferos. La llamada vía alterna o de la properdina del complemento también existe en los peces. (Sereno y Avtalion, 1979) la importancia de ésta es la posibilidad de iniciación de la reacción del complemento sin necesidad de anticuerpo, con lo que el complemento crea un mecanismo defensivo más inespecífico, esta es una ventaja para los animales ectotermos, y que las condiciones pueden no ser favorables para la síntesis proteica. La cadena enzimática del complemento es más termolábil que la de los mamíferos y a veces muestra una especificidad. (Turner, 1994)

Los leucocitos polimorfonucleares, aunque tienen la misma constitución enzimática que la de los mamíferos, por el contrario en los peces tiene una débil capacidad fagocitaria. (Ellis, 1989) Los macrófagos, cuya actividad fagocitaria es muy importante, parecen ser desprovistos de receptores para el fragmento Fc y para el C₃. (Kinkelin et al., 1991) La Proteína C Reactiva (PCR), tiene una función protectora en los mamíferos, en el plasma aparece durante la fase aguda de muchas infecciones, una diferencia

interesante respecto a los mamíferos es que la PCR en los peces es un constituyente normal y constante en el plasma de éstos, lo cual representa una línea de defensa contra cualquier microorganismo. (Turner, 1994)

La inmunidad adaptativa de los peces se representa por los linfocitos B con anticuerpos específicos o inmunoglobulinas, linfocitos T y linfocinas.

Los peces teleósteos poseen una inmunoglobulina (Ig) llamada M (IgM) la cual tiene características fisicoquímicas similares a la IgM de los mamíferos. Esta Ig en los peces presenta coeficientes de sedimentación de 19S, 16S, 7S y 6.4S con un peso molecular de 700,000 daltons y tiene una estructura tetramérica, conteniendo cadenas pesadas tipo μ , (Cone y Marchalonis, 1972) anteriormente se creía que la IgM se encontraba solamente en el suero del pez, estudios realizados en 1992 en los huevos del salmón (*Oncorhynchus keta*), demostraron que en las proteínas de las yemas se encuentra una Ig con un peso molecular de 495,000 daltons inferior al peso molecular registrado en la IgM del suero. (Fuda, Harat, Yamazaki y Kobayashi, 1992) En los peces también se identifican anticuerpos en el plasma, fluidos tisulares y el moco (del tracto digestivo, piel y branquias), no se sabe por qué mecanismo el anticuerpo pasa al moco, puede ser derivado de los anticuerpos del plasma y ser segregado al moco, o puede ser producido localmente en el epitelio mucoso, por células plasmáticas. (Houghton, Healey y Matthews, 1992) En el bagre esta Ig está formada por moléculas que varían en su estructura covalente y en sus componentes de las cadenas ligeras. (Turner, 1994) Las células B de los anfibios y peces teleósteos, se distinguen fácilmente de las células T, mediante el uso de anticuerpos anti-inmunoglobulina y anticuerpos monoclonales contra células T, respectivamente. Se ha demostrado que posiblemente la Ig sea el único tipo de receptor antigénico empleado por los linfocitos B de los peces. (Roitt y Brostoff, 1996)

El interferón (IFN) es un agente antiviral en todos los vertebrados, su modo de acción es penetrar en potenciales células huésped e impedir la replicación del ácido nucleico viral, el aumento de la velocidad de síntesis del IFN *in vitro* con la elevación de la temperatura podría demostrar la resistencia de los peces frente a algunas virosis y en la viremia primaveral de la carpa, el IFN no ha sido aislado ni purificado hasta el momento. (Kinkelin et al., 1991)

La inmunidad mediada por células es la responsable de las reacciones de hipersensibilidad retardada y el rechazo de alo-injertos o alo-trasplantes. La hipersensibilidad retardada se caracteriza por una acumulación de células linfoides ocasionada por la presencia de ciertos antígenos a los que el animal ha sido sensibilizado; se ha demostrado la actividad de este tipo de respuesta en estadios tardíos de las enfermedades granulomatosas de los peces. (Rijkers, 1981)

El rechazo de alo-injertos se manifiesta cuando se hace el trasplante de un tejido de un individuo a otro de la misma especie pero genéticamente diferente, es decir, un alo-injerto, estimula una respuesta inmune específica que da lugar al rechazo de los tejidos trasplantados; se caracteriza por infiltración del tejido trasplantado por células linfoides capaces de causar lisis específica de las células extrañas al llegar a establecer contacto físico. Los teleósteos muestran una respuesta de rechazo de alo-injertos bien desarrollada. Hildemann en 1970 realizó trasplante de escamas en el "goldfish" y demostró la naturaleza específica de la reacción de rechazo de alo-injertos en los peces. (Turner, 1994) Entre la aparición de la inmunidad específica, el desarrollo del timo y de los linfocitos circulantes existe relación directa, sólo se puede registrar la presencia de células ejecutivas del sistema inmune que son los linfocitos circulantes, a los que se ha dado en conjunto con los macrófago la denominación de células inmunocompetentes. (Ellsaesser, Bly y Clem, 1988) Experimentos con linfocitos marcados en los peces mostraron que los linfocitos pequeños migraban a tejido linfoide en el riñón y el bazo, que mientras eran residentes en estos órganos incorporaban el compuesto uridina tritiada a su RNA. Los linfocitos migran también hacia tejidos no linfoides y pulpa roja esplénica, lo cual indica que existen al menos dos poblaciones de linfocitos que tienen patrones de migración diferentes. (Faulman, Cuchens, Lobb, Miller y Clem, 1983) Los linfocitos poseen en sus membranas celulares receptores capaces de reconocer determinantes antigénicos lo que permite diferenciarlos de los mamíferos. (Bogner y Ellis, 1977)

En los vertebrados inferiores, como los peces y los anfibios, los compartimientos linfoide y mieloides se encuentran entremezclados. En los peces existe un conjunto incompleto de tejido mielolinfoide, que carece de médula ósea, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a las mucosas (por sus siglas en inglés: MALT); (Sima y Veyvicka, 1993; Roitt y Brostoff, 1996) en cambio, a este nivel de evolución se observa la presencia de un timo bien desarrollado, así como el bazo y tejido linfomieloide asociado con el riñón y el hígado (Figura 1), aunque los peces mixinoideos no poseen un verdadero timo, y el bazo es tan sólo rudimentario. (Turner, 1994) Una característica especialmente notable con respecto al tejido linfomieloide de los peces es la abundancia de centros de melanomacrófagos en el hígado de las formas anteriores, así como en el bazo y el riñón de los teleósteos. Estos centros están densamente cargados de pigmentos (hemosiderina, ceroides, melanina y especialmente lipofucsina); se ha sugerido que los centros representan un análogo primitivo de los centros germinales hallados por primera vez en los tejidos linfoides de las aves. (Van Muiswinkel, Lamers y Rombout, 1991) La acumulación de pigmentos en los macrófagos de los peces pueden estar parcialmente relacionada con los altos niveles de grasas saturadas que existen en esos animales, a fin de lograr fluidez en las membranas

a bajas temperaturas estas grasas son propensas a la peroxidación y a la formación de lipofuscina. (Hardie et al., 1994; Schäperclaus et al., 1992)

ESPONJAS																				
CELENERADOS																				
ANELIDOS																				
MOLUSCOS																				
ARTROPODOS																				
EQUINODERMOS																				
TUNICADOS																				
CICLOSTOMADOS																				
PECES CARTILAGINOSOS																				
PECES OSEOS																				
ANFIBIO																				
REPTILES																				
AVES																				
MAMIFEROS																				
		MACROFAGOS	LEUCOCITOS	LINFOCITOS T	LINFOCITOS B	TIMO	TEJIDO LINFÓIDE Y MIELÓIDE	BAZO	MEJULA OSEA	GANGLIOS LINFÁTICOS	CENTROS DE PROLIFERACION DEL TEJIDO LINFÓIDE									

Figura. 1. Evolución de los órganos y células del sistema inmune. (Cooper, 1985)

Timo

El timo en los peces teleósteos es un órgano par compacto situado en el ángulo superior del opérculo, es el primer órgano linfoide que aparece en el desarrollo ontogénico y filogénico, (Turner, 1994) se desarrolla embriológicamente a partir de los primordios asociados al epitelio de los sacos faríngeos.

Este órgano está constituido al igual que en los mamíferos, de una zona cortical y medular (Figura 2). La malla de tejido cortical contiene linfocitos pequeños (timocitos) y en diversos estadios de desarrollo, agrupados en forma compacta y uniforme; mientras que la zona medular está formada principalmente por linfocitos maduros en pequeña cantidad distribuidos entre el epitelio reticular y macrófagos. (Ellsaesser et al., 1988)

La involución tímica en los peces se inicia al llegar a la madurez sexual, existe evidencia que implica que el timo, en los peces, es un órgano linfoide central más que periférico. La dosis de carbono coloidal (tinta china) inyectada a un pez es rápidamente absorbida por los fagocitos presentes en la sangre, el corazón y el bazo, pero no llega a penetrar en el tejido tímico, sugiriendo que el timo de los teleósteos posee una

estructura endotelial vascular especializada con permeabilidad selectiva. (Ellis, 1989) Existe una gran producción de linfocitos en el timo, pero estos deben migrar rápidamente a órganos como: riñón, bazo, hígado, tracto digestivo y branquias. (Kinkelin et al., 1991)



Figura 2. Corte transversal del timo de *Chelon labranus* (bagro), aproximadamente de 6 meses, que muestra una zona superficial o cortical oscura (C) y una central o medular mucho más clara (M).

Riñón anterior

El riñón de los teleósteos contiene linfocitos en diferentes etapas de división, consta de dos partes: el pronefros ó riñón anterior, y el mesonefros o riñón excretor; el riñón anterior de los teleósteos posee linfocitos en diversas etapas de división y en el cual tiene lugar la eritropoyesis, linfopoyesis y granulopoyesis, realiza funciones muy similares a las de la médula ósea y los ganglios linfáticos de los mamíferos. (Turner, 1994)

Bazo

El bazo muestra en los peces una constitución más sencilla que en los mamíferos. En el bazo de los teleosteos se encuentran linfocitos y centros germinales cubierto de tejido conjuntivo en forma de trabéculas, los cuales se bifurcan formando una estructura tridimensional al unirse sus extremos a manera de red. (Roberts, 1989; Van Muiswinkel et al., 1991) Al igual que en los mamíferos el bazo en los peces se encuentra separado en dos zonas: pulpa roja, con función hematopoyética y pulpa blanca que posee dos tipos de linfocitos T y B con la prevalencia de los primeros (Figura 3).

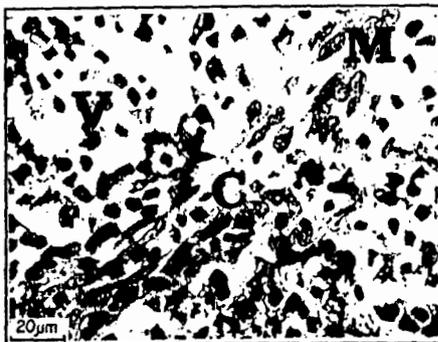


Figura 3. Corte histológico del bazo de trucha arco iris. La estructura se compone de senos venosos (V) con eritrocitos, confundidos con las manchas de macrófagos (M) que rodean a los capilares sanguíneos (C) y a los focos linfocitarios.

En 1971, Neale y Chacin investigaron que el bazo puede ser suministrado por células productoras de anticuerpos originadas en el riñón y funciona también como filtro purificador de la sangre, debido a las vainas elipsoides. (citado en Ellis, 1989)

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS DE LOS PECES

La RIC que depende de la actividad de los linfocitos se considera estrechamente relacionada con la temperatura, ya que en el interior de la zona de tolerancia de los animales un cambio de temperatura produce frecuentemente una alteración rápida, directa y proporcional a la velocidad de los procesos fisiológicos. Los linfocitos son más sensibles al cambio de temperatura por ser células en constante proliferación. (Vallejo, Miller, Harvey, Cuchens, Warr's y Clean, 1992)

En 1948, Bisset observó que al reducir la temperatura por debajo de un nivel crítico, un pez o anfibio que había sido inmunizado y estaban produciendo anticuerpos mostraban una reducción de los niveles séricos de inmunoglobulinas. Estos niveles permanecen bajos hasta que la temperatura se eleva nuevamente por encima del nivel crítico. (citado en Roberts, 1989) También Cone menciona que a baja temperatura hay inmunosupresión en la respuesta humoral primaria y la producción de anticuerpos es atrasada, deprimido o totalmente inhibido dependiendo de la especie de pez, también

se ha reportado que se induce tolerancia a ciertos antígenos y se reduce el número de leucocitos del riñón anterior. (Cone y Marchalonis, 1972)

En 1979 Sereno comprobó, que los peces teleósteos tienen un proceso muy lento en la liberación de inmunoglobulinas séricas, cuando las bajas temperaturas no permiten reaccionar al SI, y el estímulo antigénico queda conservado incluso hasta 135 días en el organismo del pez, obteniendo respuesta cuando la temperatura es adecuada para la inmunogénesis. (Sereno y Avtalion, 1979)

Entre 10 a 20° C y utilizando coadyuvantes se acentúa la formación de anticuerpos en los peces, el efecto reforzante del coadyuvante en los teleósteos es mucho mayor incluso a temperaturas bajas. (Bly y Clem, 1992)

La temperatura crítica por debajo de la cual ya no se desarrolla la respuesta inmunológica varía según las especies, está en relación con la gama natural de temperaturas del medio. Las especies de aguas más templadas como la carpa espejo, no producen anticuerpos si la temperatura del agua es de 12°C o menos, mientras que la trucha arco iris mantiene su producción de anticuerpos hasta temperaturas de 5°C. La formación de anticuerpo se retrasa y no alcanza la intensidad observada en peces mantenidos 15 días en agua a 25° C y pasados luego a agua a temperatura de 12° C. Si a los peces se les inocula el antígeno a temperatura de 25° C y después los mantienen a 12° C en un lapso de 8 días desde la inoculación, aparece una respuesta normal de anticuerpos, con una respuesta secundaria normal en estos peces sometidos a 12°C, siempre y cuando su respuesta primaria se haya dado a 25°C, lo cual sugiere que la fase de inducción es termodependiente; (Rijkers, Elizabeth, Frederix y Van Muiswinkel, 1980) Avtalion indica que si los peces han estado en contacto con el antígeno durante un período inicial breve a temperatura superior a la crítica, la producción de anticuerpos se desarrollará normal e independientemente de la temperatura del medio. (Turner, 1994)

En 1994 Hardie demostró, que la producción del factor activador de macrófago (MAF) en la trucha arco iris es dependiente de la temperatura, los leucocitos estimulados *in vitro* a una temperatura de 14° C son capaces de proliferar y liberar MAF, aún hasta temperaturas tan bajas como 6° C. Las células T citotóxicas se inhiben a bajas temperaturas, debido a la alteración de la transducción de la señal por una falta de los factores de crecimiento para los leucocitos. Esto demuestra la dependencia de los leucocitos a la temperatura no únicamente *in vivo* sino también *in vitro*. (Hardie et al., 1994)

La producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células son suprimida cuando los animales poiquilotermos inmunizados se mantienen a temperaturas entre 8°C a 15°C, pero la RI se inicia cuando los animales inmunizados son transferidos a temperaturas entre 25° C a 37° C. La respuesta inmune a la inyección intraperitoneal de eritrocitos de caballo (HRBC) en los peces se da en dos fases: 1) la respuesta inicial de

células formadoras de rosetas (RFC) es independiente de la temperatura, pero proporcional a la dosis del antígeno; 2) la aparición de anticuerpos circulantes es dependiente de la dosis de antígenos y de la temperatura del medio. Esta imposibilidad de mantener a 20° C los niveles altos de RFC indica que la temperatura puede influir en los pasos tempranos de maduración de células secretorias de anticuerpos. (Cone y Marchalonis, 1972)

La RIC en vertebrados poiquiloterms es dependiente de la temperatura, el rechazo a injertos se disminuye o completamente se ausenta a temperaturas bajas. Los límites por arriba o por debajo de la temperatura en la cual hay RI, se encuentran estrechamente relacionados con los intervalos de temperatura que las especies consideran como su hábitat. La relación entre la temperatura y el tiempo de supervivencia de un injerto en el *Cyprinus carpio* indican que se necesitan dos temperaturas sensibilizadoras en el proceso de rechazo de injertos. Sin embargo de acuerdo a otros autores el estudio de diferentes animales, ha permitido saber que la primera fase en la RI es el proceso de reconocimiento del antígeno el cual es relativamente independiente de la temperatura, (Rijkers et al., 1989) lo cual es contradictorio a lo anterior.

La sugerencia de que el frío induce tolerancia resulta de una modificación en la inmunorregulación de células cooperadoras, este parece suprimir la producción de células nuevas, lo cual se ha observado *in vitro*. (Bly y Clem, 1991; Turner, 1994)

Precisamente en el bague de canal se ha observado que existe en estas condiciones de baja temperatura una disminución de células cooperadoras. Por tanto la inmunosupresión inducida por temperatura baja no involucra supresión de células T ya activas, sino la inhibición específica de la activación de una nueva generación de células T cooperadoras. Los leucocitos de pez inmunizados con antígenos humanos expuestos *in vitro* a una temperatura de 11°C produce una baja respuesta secundaria de anticuerpos. Sin embargo, si el bague de canal es puesto a una temperatura de 23°C sus células tienen una buena respuesta secundaria *in vitro*. Por lo anterior se puede afirmar que la inmunización a temperatura baja con un antígeno no induce tolerancia específica. Como medida profiláctica para la acuicultura implica que la inmunización se debe de realizar en primavera-verano, con el objeto de que al llegar el invierno el pez ya tenga una buena dosis de anticuerpos circulantes. (Bly y Clem, 1991)

La temperatura del cultivo de linfocitos tiene una influencia determinante en el crecimiento de las células, el intervalo de temperatura de incubación óptima de las células de la mayoría de los animales endotérmicos esta entre 35 a 37° C. Se ha demostrado que en el cultivo celular de estos que a temperaturas bajas se deprime el metabolismo. Sin embargo los cultivos celulares de animales poiquiloterms se incuban normalmente a temperaturas relativamente bajas, las células de peces de agua fría son cultivadas entre 15 y 20° C, las células de peces de agua cálida son

cultivadas entre 22 y 27° C, las células de insecto son cultivadas en un intervalo entre 23 y 27° C. (Jakoby y Pastan, 1979) Debe haber una explicación racional a todo lo anterior.

Se sabe que a baja temperatura menos de 17° C selectivamente se suprime *in vitro* la respuesta de los leucocitos o fagocitos en el bague de canal así como en otras especies. El efecto de la temperatura sobre la inmunidad celular no específica en los peces ha sido estudiado solamente en fagocitos -la primera línea de la defensa inmunológica- cuando las bacterias se eliminan rápido aún en los peces mantenidos a temperaturas bajas esto es gracias a la función de los mencionados fagocitos-neutrofilos. En el bague de canal la función de los neutrofilos cesa a 10° C. La temperatura de 17° C es mínima para la aclimatación del bague de canal y es límite para la función de sus leucocitos y se considera como temperatura óptima para la función de fagocitos del bague la temperatura de 27° C. (Ainsworth, Dexiang, Waterstrat y Greenway, 1991) No se han encontrado datos respecto al cultivo de linfocitos de bague de canal.

EL ESTRÉS Y LA RESPUESTA INMUNE

Desde 1936, Selye describió el síndrome general de adaptación o estrés, éste síndrome abarca un conjunto de cambios orgánicos que entran en juego como respuesta del organismo a toda una variedad de estímulos nocivos, que provocan el incremento de los adrenocorticoesteroides, involución del timo, disminución de la masa de los órganos linfoides y úlceras gastrointestinales. (citado en Stratakis, 1995) Los factores estresantes son aquellos estímulos ambientales cuya percepción por el sistema nervioso no coincide con la representación neural de experiencias previas incluyen tanto cambios internos (lesión tisular, hipoglucemia, hemorragia, infección, etc.), como del medio externo (frío, calor, agresión, etc.). (Alvarez y García, 1992) En los animales de experimentación el estrés crónico aumenta la mortalidad de los animales infectados con virus y disminuye el rechazo de trasplantes, por lo que el estrés tiene un efecto inmunosupresor. (Okimura, Satomi y Ohkuma, 1994) En los peces, un cambio brusco de temperatura provoca estrés y como consecuencia disminución en la RI. (Schäperclaus et al., 1992)

Los peces óseos tienen un sistema nervioso compuesto de sistema cerebroespinal (encéfalo, médula espinal, ganglios nerviosos craneales y raquídeos) y el sistema vegetativo (ganglios, nervios simpáticos y parasimpáticos). (Lagler et al., 1990) El sistema nervioso puede ser el asiento de diferentes afecciones o infecciones, el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal, es puesto en juego a causa de un cierto número de agentes mórbidos que comprometen al sistema inmune, lo cual afecta la salud de los peces. (Kinkelin et al., 1991)

El eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal es estimulado por todos los factores de agresión presentes en el ambiente que reacciona desencadenando estrés, esta respuesta se traduce en la elaboración de catecolaminas (Stratakis, 1995) y de corticoesteroides en el tejido suprarrenal que intervienen en la movilización y en la utilización de las reservas energéticas así como en el equilibrio hidromineral. (Alvarez y García, 1992) La compensación del estrés tiene un costo energético que repercute el rendimiento de los animales; por medio de experiencias de acondicionamiento, se ha demostrado que la respuesta nerviosa del pez tiene como en los mamíferos, un papel fundamental en el estrés. Las manipulaciones piscícolas son generadoras de estrés, parece que toda la patología debida al ambiente siempre es consecuencia del estrés y puede ser la causa directa de morbilidad. (Schäperclaus et al., 1992) En las explotaciones productivas intensivas la selección y el transporte de los animales son algunas de las causas de las agresiones más frecuentes. La anatomofisiología de los peces es sensible a los efectos del estrés, el cual es capaz de perturbar, al menos eventualmente, la respiración, el metabolismo y la RI, como consecuencia se tiene la disminución de los rendimientos, lo cual puede conducir a la manifestación de infecciones ya existentes en animales portadores o al contagio en el momento de la

manipulación. (Lagler et al., 1990)

En los últimos 20 años se ha demostrado que existe una correlación bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmune y los efectos del estrés sobre la respuesta inmune han sido atribuidos al aumento de la secreción de glucocorticoides que se produce en dichas situaciones. (Roitt y Delves, 1992) y la duración e intensidad de la respuesta del eje adrenal al estrés depende el grado de estimulación, durante los periodos en los cuales se incrementa la secreción de cortisol, se suprimen los ritmos circadianos del eje adrenal y la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides esta prácticamente ausente; en experimentos realizados en animales adrenalectomizados se observa una inhibición de la proliferación de linfocitos. (Alvarez y García, 1992)

La respuesta del sistema inmune ante una agresión no sólo da lugar a los procesos fisiológicos encaminados a eliminar al agente extraño, sino también es capaz de estimular el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. La interleucina 1 (IL-1), producida por los macrófagos es un mensajero en la comunicación entre ambos sistemas. Junto con la IL-1, otros mediadores del sistema inmune tales como la IL-2, IL-6, la timosina 1, timosina 4, el interferón IFN- α y el INF- γ los cuales también son capaces de modular la actividad del sistema neuroendócrino. (Stratakis, 1995)

Un factor inespecíficos que influye en la resistencia a la enfermedad son las hormonas. Las dosis bajas de esteroides y tiroxina, pueden estimular la RI, en tanto que las dosis altas de esteroides, así como testosterona y progesterona, tienen acción inmunosupresora. En los animales con estrés, el aumento de la producción de esteroides puede ser inmunosupresor y ayudar así a que se precipite la enfermedad. (Ursin, 1994) Un ejemplo del efecto de este tipo de estrés se ve en los bovinos sometidos a transportes prolongados en condiciones que no son óptimas, como consecuencia de este manejo son más susceptibles a que contraigan infecciones por virus o bacterias. (Tizard, 1989)

En condiciones naturales existen en el pez todos los grados de estrés en función de la intensidad y duración de la agresión. En principio esta reacción se produce en numerosas situaciones, caracterizadas por la presencia de componentes del medio ambiente desfavorables a la fisiología de los peces. En 1981 Schreck por medio de experimentos de acondicionamiento, demostró que la respuesta nerviosa del pez tiene como en los mamíferos, un papel fundamental en el estrés. (citado en Kinkelin et al., 1991) Durante el último decenio, apenas hay operaciones piscícolas de las que no se sospeche que son generadoras de estrés, como en las explotaciones intensivas, la selección, manejo, cambios fisicoquímicos bruscos y el transporte de los animales son algunas de las causas de agresiones más frecuentes, por lo que se observa que el pez en condiciones naturales esta sometido a estrés, pero que al ser manipulado productivamente este estrés puede multiplicarse varias veces. (Schäperclaus, 1992)

INMUNOMODULACION Y EXTRACTOS TIMICOS

Se le llama inmunomodulación al proceso de modificación de la RI bajo diferentes estímulos, los cuales pueden ser moléculas, factores ambientales o sustancias. El inmunomodulador es una sustancia de origen vegetal o animal, actualmente los de origen tímico han sido muy estudiados y se sabe que normalizan los parámetros inmunológicos.

En los últimos años se ha producido un gran adelanto en la determinación de los compuestos tímicos activos, las cuales realizan una función inmunomoduladora. (Tizard, 1989) Actualmente se han descrito más de 15 sustancias extraídas del timo con propiedades inmunomoduladoras. La diferenciación y maduración de las células que surgen de la médula ósea termina en el timo, con la formación de el linfocito T maduro. Los extractos tímicos, como la timosina, timoestimulina, Tactivina, timopoyetina y las hormonas tímicas purificadas o sus análogos sintéticos, ejercen un efecto *in vitro* sobre los linfocitos periféricos, favoreciendo su maduración y proliferación tras la estimulación con antígenos o sustancias mitogénicas. (Arion, 1989) Estas sustancias potencian la producción de interferón inducida por medicamentos o sustancias mitogénicas por los efectores T y la actividad de las células T supresora e intensifican muchas funciones de los linfocitos T como la citotoxicidad y la actividad cooperadora. Varios preparados tímicos elevan la actividad fagocítica de los macrófagos y granulocitos, muchos extractos tímicos aumentan la resistencia *in vivo* a algunas infecciones y modifican el pronóstico de los ratones con tumores. Datos experimentales indican que los extractos tímicos alteran la transmisión neuromuscular y actúan sobre el eje hipotálamo-hipofisiario. (Bach, Pleau y Dardenne, 1980)

Actualmente se han extraído varios polipéptidos del timo. Aquellos que han sido químicamente bien definidos constituyen una serie de entidades moleculares, entre las cuales encontramos a la Timosina $\alpha 1$, timopoyetina, timulina, Tactivina y Factor Humoral Tímico (THF γ -2). (Arion, 1989)

Timosina $\alpha 1$

El primer péptido en ser aislado, es un extracto del timo con 15-20 péptidos, de 28 residuos de aminoácidos con un peso molecular aproximado de 3.1 kDa y acetilados en su extremo amino-terminal, con un punto isoelectrónico de 4.2. Se ha demostrado que induce la expresión de algunos antígenos de diferenciación de células T del ratón, Thy, Lyl1 y Lyl2-3, incrementa la respuesta mitogénica de linfocitos murinos, estimula la

producción de anticuerpos, infocinas y modula la expresión de la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (Tdt), la timosina- α 1 es termoestable, quizá porque no contiene cisteína y carece de puentes de disulfuro, en estudios *in vitro* intensifica la actividad de las células T supresoras. (Bach et al., 1980)

Timopoyetina

La timopoyetina fue aislada del timo de becerro por Goldstein en 1972, posee efectos neuromusculares además de acciones sobre el SI, tiene un peso molecular de 5.5 kDa es una proteína termoestable formada por 49 aminoácidos; se ha demostrado que induce varios aloantígenos específicos de células T *in vitro* (rechazo de carcinoma 3LL, prevención de autoinmunidad en ratones y generación de células T citotóxicas), su actividad biológica está comprendida en el péptido TP5 compuesto de los residuos 32 al 36 (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr). (Bach et al., 1980) La timopoyetina se une a receptores de la membrana celular presentes en linfocitos T, involucrando la estimulación de ciclasa de adenilato o ciclasa de guanilato, estudios recientes demostraron que la timopoyetina se une con alta afinidad al receptor de acetilcolina. (Barrete, 1990)

Timulina

La timulina, antes conocida como factor tímico del suero (FTS), ha sido purificada del suero de cerdo, del humano y a partir del timo de becerro. Es un nonapéptido (Glu-Ala-Lys-Asn-Ser-Gln-Gly-Ser-Asn), (Tizard, 1989) que tanto en forma natural como sintética liga zinc, tiene un peso molecular 0.8 kDa y un punto isoelectrico de 7.3. Este pequeño péptido se sintetiza en los corpúsculos de Hassall, (estructuras refráctiles redondas que se observan en el timo). Si se inyecta a animales deficientes en células T, la timulina induce en ratones la aparición del antígeno Thy 1, incrementa la formación de rosetas por los linfocitos y reduce la población de células T supresora. (Barrete, 1990)

Tactivina

La Tactivina esta constituido por una mezcla de 16 fracciones compuesta de polipéptidos de origen tímico extraídos por métodos bioquímicos del timo de becerro, el estudio de la masa y las propiedades isoelectricas de las moléculas que lo componen indica su heterogeneidad, por lo que su peso molecular puede variar entre 1.2 a 6 kDa. (Arion, 1989)

Desde 1985 la Tactivina se produce en la Industria farmacéutica de Rusia y se encuentra con la aprobación clínica en varios países (Alemania, Suecia, Francia, etc.), es

una sustancia inmunotrópica que se puede considerar como verdadero inmunomodulador, esto significa que si los parámetros inmunológicos son normales, la Tactivina no los modifica, en cambio si están elevados los disminuye a la normalidad; y si están disminuidos los eleva hasta cifras normales. La Tactivina actúa exclusivamente sobre los linfocitos T, se liga al receptor de la membrana con mayor afinidad, regula la síntesis de linfocinas y afecta a las células T supresoras. El estudio *in vitro* de la Tactivina induce la expresión del antígeno Thy 1, la Tactivina junto con PHA induce la transformación blastoide de linfocitos T en sangre periférica en pacientes con varias enfermedades, la Tactivina tiene una actividad completa de un año a temperatura ambiente y de 3 años a temperatura de 4 a 10°C. La Tactivina es utilizada en el tratamiento de inmunodeficiencias, procesos de infección, crecimiento tumoral y síndrome del cansancio. (Arion, 1989)

Posibles Mecanismos de Acción de la Tactivina

Desde 1972, se encuentran preparaciones de péptidos de origen tímico, los cuales ayudan a las células T a que se diferencien y desarrollen su actividad biológica. Los péptidos tímicos también potencian la producción de interferón inducida por medicamentos o sustancias mitogénicas. Algunos extractos tímicos elevan la actividad fagocítica de los macrófagos y de los granulocitos. Se ha comprobado que el timo desarrolla por lo menos una parte de su función produciendo péptidos que regulan muchos de los procesos en el organismo. (Arion, 1989; Bach et al., 1980)

Los estudios experimentales en la Tactivina indican su heterogeneidad molecular la cual resulta principalmente de la diversidad funcional de sus moléculas que la constituyen. En el proceso de extracción de la Tactivina hay degradación de algunas de sus moléculas, aunque tal degradación podría contribuir a la heterogeneidad molecular. (Arion, 1989)

La heterogeneidad funcional de los péptidos de origen tímico ha sido cuestionada en base a que algunas de las moléculas de timulina y timosina exhiben su actividad en muchas pruebas inmunológicas. Esta puede ser una discrepancia la cual resulta fácilmente explicada, ya que algunos péptidos reguladores actúan inhibiendo o activando mecanismos bioquímicos. Los péptidos que constituyen a la Tactivina emplea o ejerce una influencia regulatoria en la diferenciación y migración de las células contenidas y la maduración de los linfocitos T en el timo, bazo, nódulos linfáticos y sangre periférica. La Tactivina es capaz de regular algunos procesos bioquímicos en células no linfoides. Pruebas clínicas han demostrado su alta potencialidad terapéutica. En el proceso de maduración de los linfocitos T van

adquiriendo antígenos de membrana que los caracteriza y da lugar a subpoblaciones. El péptido tímico estimula la expresión de las moléculas sobre la membrana del linfocito T. En base a los datos experimentales disponibles, se puede representar esquemáticamente cuales son los procesos bioquímicos que se disparan para hacer que diferentes péptidos resulten responsables de la regulación de los linfocitos; a continuación se representa en la figura 4.

Es un proceso bioquímico que da inicio cuando influye en el metabolismo del calcio, en el sistema de ciclasas que activa en la expresión de algunos de los genes.

Las investigaciones sobre los mecanismos de inmunorregulación de los péptidos tímicos es un poco especulativa ya que se requiere de una verificación experimental más detallada purificando cada una de las fracciones que constituyen a la Tactivina.

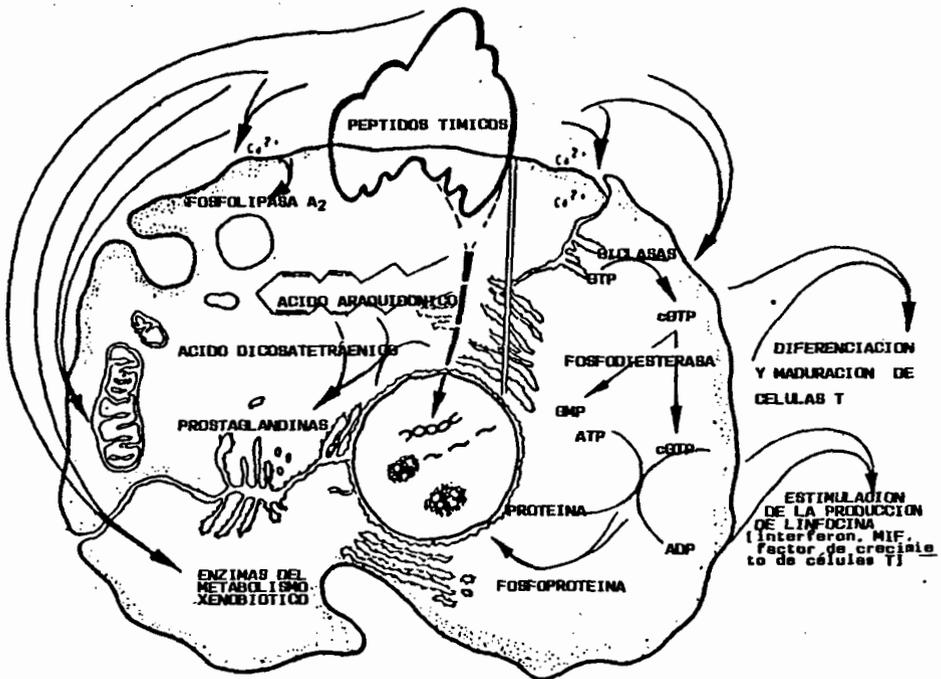


Figura 4. Posibles mecanismos de acción de los péptidos tímicos en los procesos celulares bioquímicos. Abreviaturas por sus siglas en inglés: **GTP** = trifosfato de guanósina; **cGTP** = trifosfato de guanósina cíclico; **GMP** = monofosfato de guanósina; **ATP** = trifosfato de adenosina; **ADP** = difosfato de adenosina; **MIF** = factor de inhibición de la migración de macrófagos.

Factor Humoral Tímico (THF γ -2)

El factor humoral tímico (THF γ -2) se prepara con timo de becerro, que consta de 31 aminoácidos con un peso molecular de 3.3 kDa y un punto isoelectrico de 5.6. El THF γ -2 restaura la competencia de linfocitos T en ratones timectomizados, aumenta la actividad de las células TH₁ (Bach et al., 1980) estimula la respuesta del cultivo de leucocitos y promueve la respuesta a las lectinas (principalmente ConA) para células T. (Barrete, 1990) El péptido tanto en forma natural como sintética, tiene la misma actividad biológica *in vivo* e *in vitro*, induciendo un incremento en la proliferación de linfocitos y la producción de interleucina (IL-2) por las células del bazo de ratones timectomizados al nacer. (Benjamini et al., 1996)

FISIOLOGIA DE LOS EXTRACTOS TIMICOS

Bajo un criterio endocrinológico y fisiológico, solamente la timopoyetina, Tactivina y la timulina pudieran ser reconocidos como verdaderas hormonas. Las tres son exclusivamente producidas por el epitelio tímico e inducen la diferenciación de las células T. A la inversa, la timosina es producida por otros órganos y su papel fisiológico en la diferenciación de las células T queda por ser establecido. La producción de Tactivina y timulina están bajo control pleiotrópico involucrando Tactivina y timulina en si misma y de otras hormonas como la tiroidea, la pituitaria y hormonas esteroideas. La Tactivina y la timulina son capaces de modular la liberación de hormonas pituitarias incluyendo ACTH, β endorfina, prolactina y hormona del crecimiento. La timopoyetina y Tactivina pueden también incrementar los niveles de ACTH, β endorfina y β lipotropina. (Bach et al., 1980; Arion, 1989)

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS TIMICOS SOBRE LOS MARCADORES Y FUNCIONES DE LOS LINFOCITOS

Los extractos tímicos tienen dos principales acciones biológicas sobre las células T y sus precursores inmaduros: induce la expresión de marcadores y potencian la activación de varias funciones de las células T. Aunque no está del todo establecido y se requiere de mayor comprobación experimental. (Arion, 1989)

EXPERIMENTOS DE INDUCCION

Los péptidos tímicos tienen un efecto inductor sobre la mayoría de los antígenos de diferenciación, actuando sobre células linfoides que carecen de esos antígenos, ésta inducción es obtenida cuando los extractos tímicos son usados a baja molaridad, lo cual se lleva a cabo en menos de 60 minutos de cultivo y puede ser demostrada en células T muy tempranas (células esplénicas de ratón desnudo). La demostración se hace solo en subpoblaciones de células precursoras por previa separación de las células blanco usando ya sea gradientes de densidad o formación de rosetas. Las hormonas tímicas pueden actuar como inductores fisiológicos de expresión de marcadores de células T. (Bach et al., 1980)

INTENSIFICACION FUNCIONAL DE LAS CELULAS T

Los péptidos tímicos estimulan varias funciones de las células T normales y deficientes en ratones y en humanos. El efecto regulador de la timopoyetina, Tactivina y timulina, parecen depender del estado subyacente del SI, estos extractos tímicos pueden tender a normalizar el balance inmune, ya sea intensificando sistemas suprimidos o estimulando mecanismos supresores en estados hiperreactivos.

El efecto de los extractos tímicos se aplica tanto a funciones cooperadoras como supresoras, con una predilección por células T supresoras a dosis altas en mamíferos, la inmunoestimulación por timopoyetina, Tactivina y timulina incluyen la restauración de la avidéz de los anticuerpos en animales envejecidos o timectomizados, la intensificación de la producción de anticuerpos en ratones viejos, la estimulación del rechazo al injerto de la piel hembra-macho y el incremento en la liberación de interferón- γ y de IL-2 por células estimuladas por mitógenos, la supresión en la formación de anticuerpos, la abrogación de la hipersensibilidad tipo retardada, sin causar inmunodeficiencia un efecto transferible por células T y prevenido con ciclofosfamida; se puede asumir que los extractos tímicos actúan a distancia del timo, como inmunomoduladores, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de los subconjuntos de células T. (Benjamini et al., 1996)

Los extractos tímicos tienen una función importante como inmunomoduladores en la diferenciación de las células T, el uso clínico de esos péptidos en forma sintética esta ahora en curso y permitirá la evaluación de su efectividad en la modulación del SI. (Bach et al., 1980)

MITOSIS Y CICLO CELULAR

El ciclo celular puede ser considerado como una compleja serie de eventos mediante los cuales el material celular se distribuye en las células hijas. La división celular es solo la fase final y microscópicamente visible de un cambio a nivel molecular. (Avers, 1983) La mayoría de las células somáticas, con excepción de las células muy diferenciadas, como las células nerviosas, siguen un ciclo que se desarrolla en dos etapas principales:

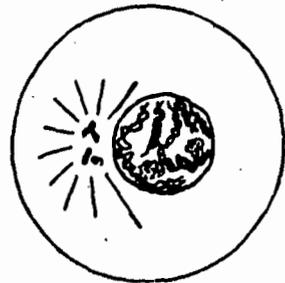
➤ **La interfase** (del latín *inter* - entre o en medio). La mayor parte de su vida la célula permanece en la interfase, período en que la información genética también es transcrita en diferentes moléculas de RNA (RNA mensajero, ribosómico y de transferencia) que, después de pasar al citoplasma traducen la información genética facilitando la síntesis de proteínas específicas. La interfase se divide en: G1, S y G2. (Golub, 1987) La proliferación de células T requiere de la interacción de la IL-2 con su receptor (IL-2R), ésta unión promueve la progresión del ciclo celular de G1 temprano a G1 tardío, dicha unión genera la expresión del receptor a transferrina (RTf) para una proteína circulante producida principalmente por hígado y bazo, la transferrina (Tf). La unión de la Tf con su receptor permite que las células T entren a la fase de síntesis (S) o fase de duplicación de ADN, después transcurre una fase en la que la célula contiene dos veces la cantidad de ADN normal, llamado período G2, este período es corto e iniciando así la proliferación (Figura 5). La existencia de G1 esta relacionada con la cantidad de crecimiento y biosíntesis que se efectúa en la célula. Si el crecimiento es mínimo, como ocurre en los embriones animales, o muy rápido, como en algunos organismos inferiores que crecen en condiciones óptimas, entonces G1 es breve o simplemente no existe. (Neckers citado en Ramírez, 1993) Dado que la síntesis del ADN puede comenzar aún antes de que haya terminado la mitosis, el período G1 parece ser el más prescindible del ciclo celular, pero si se detiene la síntesis del ADN, la célula no experimentará mitosis; la célula se hace no cicladora y a estas son denominadas células G0. (Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts y Watson, 1994)

La introducción de métodos citoquímicos como la coloración de Feulgen seguida de la cuantificación por citofotometría, brindó los primeros indicios de que la duplicación del ADN ocurre durante la interfase, midiendo la cantidad de ADN en los núcleos teñidos de color magenta. En 1950, con el desarrollo de la radioautografía, en el cual el ADN puede ser detectados mediante el examen de granos de plata, que indican la presencia del ADN recién sintetizado que ha incorporado precursores radioactivos. Los estudios realizados mediante timidina- H^3 permitieron determinar el período exacto en que se produce la duplicación del ADN y demostraron que la síntesis tiene lugar solamente durante una parte

limitada de la interfase, denominada periodo S, que a su vez es precedido y seguido por dos espacios (*gaps*) o periodos de la interfase (G_1 y G_2) en los que no hay síntesis de ADN. (Alberts et al., 1994; Avers, 1983) La duración del ciclo varía según el tipo celular, en una célula típica de mamífero el ciclo completo abarca de 18-24 horas, cuando ha sido obtenido de un tejido humano y cultivado la duración de G_1 es de 8 horas, el ADN es sintetizado durante 6 horas en la fase S, G_2 toma alrededor de 4.5 horas y la mitosis se completa al cabo de 1 hora. El ciclo celular ha sido medido en vegetales superiores el cual se lleva en un lapso de 10-30 horas, el ciclo celular del meristema de guisantes es de 20-22 horas, las células de *Xenopus* adulto tienen un periodo S que dura alrededor de 20 horas. (Avers, 1983)

➤ **La mitosis (M)** (del griego *mitos* - filamentos). Es un mecanismo que va a dar lugar a dos células hijas, que tienen exactamente el mismo número de cromosomas y la misma cantidad de ADN que la célula madre. (Golub, 1987) Se caracteriza por la sucesión de fenómenos agrupados en diferentes fases:

a) **Profase** (del griego *pro* - antes de).- El comienzo de esta etapa es la condensación de los cromosomas, éstos se hacen más cortos y gruesos, comienzan a hacerse visibles pueden ser vistos como estructura doble. Casi al término de la profase desaparece el nucléolo y la envoltura nuclear, los centriolos que han duplicado su número en la interfase se separan migrando cada uno de los polos opuesto de la célula. El huso se forma por división del centriolo en dos, cada uno de ellos se transforma en los ásteres que emigran hacia los polos colocándose cada uno a un lado y otro del núcleo. Los nucléolos desaparecen progresivamente; tiene una duración de 10 a 15 minutos. (Avers, 1983; Abbas, 1994)



b) **Prometáfase**.- Comienza con la desaparición de la membrana celular, los cromosomas se mueven libremente a la región ecuatorial de la célula y allí se ligan por el centrómero a las fibras del huso. Las mitocondrias apenas se mueven, algunas se fragmentan y otras desaparecen, los nucléolos no son visibles. (Avers, 1983)



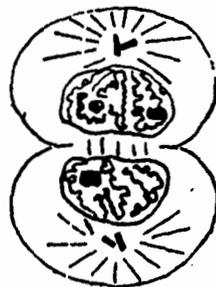
c) **Metafase** (del griego *meta* - entre).- Comienza cuando los cromosomas han alcanzado el plano ecuatorial de la célula. Dentro del plano ecuatorial, los cromosomas extienden sus brazos hacia el exterior de la célula. Al comienzo de la metafase cada cromosoma posee un centrómero, la superficie celular se modifica, en forma de vesículas. El centrómero de cada cromosoma se divide en dos centrómeros y permanecen juntos, uno al lado del otro, las dos cromátidas de cada cromosoma van a separarse y formar entonces cada una un cromosoma. Las etapas de prometáfase y metafase tienen una duración de 25 a 35 minutos. (Avers, 1983)



d) **Anafase** (del griego *ana* - atrás).- Empieza por la separación de los dos centrómeros, los cromosomas hijos precedidos por el centrómero, se desplazan hacia los polos; en la segunda mitad de esta fase, las fibras del huso se acortan hasta alcanzar la tercera o quinta parte de su longitud original. Tiene una duración de 5 a 8 minutos. (Golub, 1987)



e) **Telofase** (del griego *telo* - fin).- Comienza al detenerse la emigración de los cromosomas, estos se agrupan en abanico, en los polos celulares, formando una masa compacta hiper cromática. Los cromosomas condensados comienzan a descondensarse y adquirir gradualmente la apariencia que tenían durante la interfase, ocurre reorganización nuclear, que incluye la de nuevos nucléolos y envoltura nuclear. Los cromosomas se hacen menos compactos y se desespiralizan, la membrana nuclear va a formarse nuevamente. La parte central de la célula se estrecha progresivamente, el huso se estrangula al formarse la membrana de separación de las células hijas, las mitocondrias se reparten al azar entre las dos células hijas. La telofase termina cuando los citoplasmas se separan. (Avers, 1983)



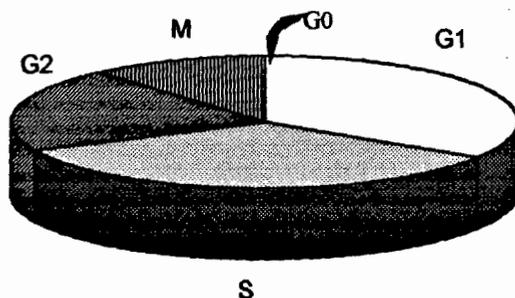


Figura 5. Ciclo celular del linfocito T

RADIATIVIDAD

La radiactividad es un proceso de desintegración espontánea del núcleo de uno o más átomos, fue descubierta en 1896 por Henry Becquerel, cuando el científico francés encontró que una sal de uranio emitía una radiación penetrante que no estaba relacionada con la fluorescencia de la sal, esta radiación se fija en las placas fotográficas e ionizaba el gas. En 1898, Pierre y Marie Curie llegaron a aislar polonio y el radio del mineral uranio, junto con Rutherford, Debieme, Soddy demostraron que la radiactividad se acompaña de una transmutación del elemento. En el año de 1919, Rutherford provocó la primera transmutación artificial del nitrógeno en oxígeno y en 1934 I. y F. Joliot-Curie obtuvieron el radiofósforo a partir del aluminio; Actualmente se producen muchos elementos radiactivos. (Castellán, 1986) Existen tres especies de radiaciones emitidas por sustancias radiactivas: los rayos α , los rayos β y los rayos γ . Las dos primeras están constituidas por corpúsculos materiales (núcleos de helio y electrones, respectivamente); en cambio, los rayos γ son ondas electromagnéticas, semejantes a los rayos X, pero de frecuencia más elevada (fotones de alta energía). Si las radiaciones emitidas por un cuerpo radiactivo se hacen pasar a través de un fuerte campo magnético perpendicular a las trayectorias, los tres componentes α , β , y γ , se separan. Algunas de las principales propiedades son:

rayos α . - Carga - 2e; masa - 6.6×10^{-24} g; velocidad de emisión, $c/10$; energía cinética 2,3 MeV; poder ionizante, notable.

rayos β . - Carga - 4.8×10^{-10} ues; masa - 9×10^{-28} ; velocidad de emisión, $3c$; energía cinética - 2-3 MeV; poder ionizante, escaso.

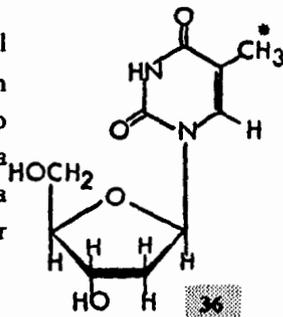
rayos γ . - Ondas electromagnéticas sin carga; longitud de onda - 0.005-1 Å; velocidad de emisión - c; poder ionizante - escapanetración - notable.

El poder de penetración varía desde una hoja ordinaria de papel o algunos centímetros de aire para los rayos α ; delgadas láminas metálicas y varios decímetros de aire para los rayos β ; hasta bloques de plomo de 30 cm de espesor y varios kilómetros de aire para los rayos γ . Un elemento radiactivo se caracteriza por su período de semidesintegración (tiempo durante el cual la mitad de sus núcleos se ha desintegrado) y por su actividad (número de desintegraciones por unidad de tiempo), expresada en Curie (Ci), que equivale al número de desintegraciones por segundo producidas por 1 gramo de radio ($\approx 37 \times 10^3$). En todos los procesos radiactivos se libera energía que se manifiesta en forma de calor, esta energía resulta muy elevada si se compara con la producida normalmente en las reacciones químicas. Un gramo de radio al transformarse completamente en helio y en plomo emite una energía total de 3.7×10^{10} cal, equivalente al calor desarrollado por la combustión de 500 Kg de carbón. El período de vida media de un elemento radiactivo es el tiempo necesario para que la mitad de una cantidad dada de ese elemento se desintegre en un elemento nuevo. Así, por ejemplo, la vida media del uranio 238 es de 4 500 000 000 años, lo cual significa que para ese tiempo, la mitad del uranio 238 existente ahora se habrá desintegrado en torio 234, que a su vez tiene una vida media de 24 días. Cada isótopo radiactivo tiene una vida media característica y éstas varían ampliamente. (Castellan, 1986)

Los rayos α , β , y γ producidos en la desintegración radiactiva pierden energía cuando pasan a través de la materia. Esto sucede por transferencia de energía a los átomos, moléculas o iones con los que colisionan. Estas colisiones pueden ser elásticas, es decir, con transferencia tan sólo de energía cinética elevando la temperatura del material con el que chocan. La interacción de la radiación con la materia se produce con choques inelásticos. Un electrón de las especies con las que choca la radiación puede subir a un nivel de energía más alto absorbiendo radiación. Cuando vuelve a su estado fundamental desprende de nuevo la energía frecuentemente como luz visible. En este efecto se basa el contador de centelleo, instrumento usado para detectar y medir la radiación, la luz producida por la radiación al chocar contra un sólido orgánico o disolución, activa una célula fotoeléctrica dentro del contador. (Castellan, 1986; Benjamini et al., 1996)

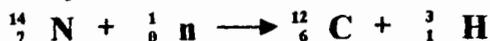
TIMIDINA TRITIADA ($^3\text{H-TdR}$)

El radionucleótido como el $^3\text{H-TdR}$, se utiliza para el diagnóstico de algunas enfermedades, puesto que la radiación emitida interfiere con la división celular, este es aplicado como marcador para la cuantificación de linfocitos T en la proliferación. (Stites et al., 1988) Howard y Pelc, en base a experimentos radioautográficos permitieron medir el ciclo celular



con $^3\text{H-TdR}$, las células marcadas en cuatro intervalos sucesivos: G, fase S, G1 y mitosis. G1 es el tiempo que transcurre entre el final de la síntesis de ADN y el comienzo de la mitosis. Durante la G2 la célula contiene el doble (4C) de la cantidad de ADN presente en la célula diploide original (2C). Después de la mitosis las células hijas entran nuevamente en el período G1 y tienen un contenido de ADN equivalente a 2C. (Avers, 1983)

El tritio es un elemento producido continuamente en la atmósfera por el bombardeo de los rayos cósmicos. Se forma por la colisión de neutrones con el nitrógeno de acuerdo con:



Es un isótopo pesado del hidrógeno, decae con una vida media de 12.4 años por decaimiento β (son electrones expulsados a gran velocidad) en el isótopo estable de helio. La radiación β consiste en una emisión de partículas cargadas negativamente, de propiedades idénticas a las de los electrones. La emisión de una partícula β (masa ≈ 0 , carga = -1) convierte a un neutrón (masa = 1, carga = 0) del núcleo en un protón (masa = 1, carga = +1). Por tanto, la emisión de la radiación beta no cambia el número másico, pero el número atómico aumenta en una unidad. (Castellan, 1986)

MITOGENOS

Los mitógenos también llamados lectinas, provienen de muchas fuentes en especial de las plantas, tienen afinidad por los azúcares de la superficie celular. (Stites et al., 1988) Como estos glucósidos pueden ser distintos entre las células B y las T, algunas lectinas tienen receptores sobre la membrana linfocitaria del primer grupo; otras se unen solo a los linfocitos B, y algunos carecen de especificidad y activan por igual ambos tipos de linfocitos. Su uso facilita la separación de las interacciones celulares de la respuesta inmune y la evaluación de inmunodeficiencias basadas en linfocitos. Un mitógeno es una sustancia que induce la división celular (mitosis). (Tizard, 1989; Barrete, 1990)

Mitógenos de linfocitos T

Las lectinas tienen un amplio espectro en la capacidad de unión, debido a su afinidad específica por ciertos residuos glucídicos, están presentes en muchos grupos de vertebrados inferiores incluyendo a los peces, (Etlinger, Hodgins y Chiller, 1976) y en los invertebrados se considera que podrían tener propiedades protectoras ante una infección por bacterias y/o parásitos; se han identificado sustancias similares en los huevos de los peces. (Fuda et al., 1992) La capacidad de respuesta a mitógenos, es una propiedad de los linfocitos a los vertebrados. En los mamíferos, la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con A) estimulan predominantemente a los linfocitos T, mientras que los

lipopolisacáridos estimulan principalmente a los linfocitos B. Los leucocitos de los peces se activan también por mitógenos, y los de la trucha arco iris, de la solla, bagre de canal y carpa dorada responden a PHA y Con A. (Faulman et al., 1983; Rocher, Troutaud y Deschaux, 1995) Los estudios comparativos con mitógenos típicos estimuladores de linfocitos T y B los realizaron Etlinger en 1976 sobre linfocitos de trucha arco iris. Sus resultados demostraron que los timocitos se estimulaban con concanavalina A, pero no con mitógenos de células B y los linfocitos esplénicos respondían a ambos tipos de mitógenos. (Etlinger et al., 1976)

Concanavalina A (ConA)

En 1919, J.G.Sumner extrajo del frijol (*Canavalia ensiformis*) dos subfracciones, una A soluble solo en una concentración de Cloruro de Sodio y otra B, soluble en 10% de Cloruro de Sodio. Sin embargo, fue hasta 1970 cuando se descubrió que la ConA se adhería a las células T (y en mucho menor grado a los linfocitos B) para que se dividan. (Tizard, 1989)

La ConA tiene un peso molecular de 102,000 daltons, es una proteína que existe como tetrámero cuando su pH es superior de 7 y como dímero cuando es inferior de 6. Compuesta de una cadena polipeptídica de 237 aminoácidos. Las subunidades peptídicas tienen bajo peso molecular (25,000daltons), y cada una fija un ion de Mn^{2+} y otro de Ca^{2+} . Es necesaria la presencia de estos metales para que cada monómero se una a los sacáridos. (Barrete, 1990)

La unión del tetrámero es por medio de enlaces salinos entre las posiciones 114 y 116 de un dímero y el ácido glutámico 192 del otro. La succinilación de los aminoácidos libres de la ConA la transforma en el dímero estable. Los receptores de la célula T para la ConA son α -D-manopiranosidos y α -D-glucopiranosidos. (Benjamini et al., 1996)

Fitohemaglutinina (PHA)

La PHA es una proteína que se extrae del frijol rojo ordinario en forma de riñón (*Phaseolus vulgaris*), esta es una sustancia que tiene acción hemaglutinante.

En 1960 fue el descubrimiento de la PHA, lo cual permitió las investigaciones sobre la activación de linfocitos en cultivos *in vitro* y el estudio de eventos semejantes subsecuentemente como el crecimiento y producción de linfocinas. (Barrete, 1990) La PHA esta compuesta de 5 glicoproteínas de estructura tetrámerica, cada una tiene una composición de dos subunidades diferentes E y L, con un peso molecular de 33 kDa y 31.6 kDa respectivamente. El tetrámero esta compuesto de una a cinco posibles combinaciones monoméricas: E_4 , E_3L_1 , E_2L_2 , E_1L_3 y L_4 . La nomenclatura E y L se deriva de las observaciones de que la subunidad E parece más efectiva para inducir la aglutinación de

eritrocitos y la subunidad L es aglutinante de leucocitos y es efectivo mitógeno de linfocitos. (Roitt y Delves, 1992)

El fraccionamiento de los extractos crudos del frijol por cromatografía de intercambio iónico y filtración molecular permitió separar el componente estimulador de los linfocitos, llamado PHA-L, de la hemaglutinina, o PHA-E. Ambas proteínas tienen pesos moleculares de 115,000 y 140,000 daltons. (Barrete, 1990) El receptor de la célula T para la PHA es N-acetil-D-galactosamina, la PHA se une a linfocitos T en el humano y en el ratón. (Roitt, 1996)

TRANSFORMACION BLASTOIDE

La identificación de un inmunógeno por parte de los receptores específicos o las sustancias mitogénicas inducen al linfocito a proliferar. Un pequeño linfocito normal es comparativamente inactivo, su núcleo ocupa la mayoría del contenido celular, una pequeña cantidad de citoplasma y pocas estructuras activas en la síntesis de proteínas, es una célula en reposo o que no se replica hasta que es estimulada por un antígeno o mitógeno desencadenando un aumento de tamaño, crecimiento del nucléolo, acumulación de ribosomas en el citoplasma, se desarrolla el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de golgi y otras estructuras necesarias para la síntesis de proteínas; se replica el DNA y sobreviene la mitosis. Este fenómeno se llama transformación blastoide. (Stites et al., 1988)

Los estudios realizados con linfocitos que habían sido activados de manera inespecífica por mitógenos brindaron datos sobre los efectos desencadenantes de la síntesis de anticuerpos. El primer fenómeno que se observa después de la estimulación de los linfocitos por los mitógenos es, la formación de casquetes polares constituidos por receptores para el mitógeno (Figura 6). Se observa que se forman casquetes sobre células que no estaban sufriendo transformación blastoide, y que las células podían dividirse después de la estimulación, sin que llegaran a formarse los casquetes polares. El fenómeno inicial crítico que conduce a la activación de los linfocitos, y que al parecer se produce después de la estimulación por mitógenos, es una endocitosis de los receptores. Algunos procesos bioquímicos para la activación de los linfocitos, empiezan con el aumento en el transporte por la membrana, y se acelera la reposición de los fosfolípidos de la propia membrana. También se aumenta la permeabilidad para los nucleósidos, ácidos aminados y azúcares al mismo tiempo se acelera el paso de Ca^{++} y K^{+} . Se ha demostrado que la fluidez de la membrana se incrementa pocos minutos después de adicionar a los linfocitos los mitógenos. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la influencia de estas modificaciones de la membrana sobre determinados fenómenos intracelulares que pudieran desencadenar la activación de la célula. Una posibilidad podría ser la aparición de nucleótidos cíclicos, que como "mensajeros secundarios" activarían las cinasas de proteínas específicas, dependientes de nucleótidos cíclicos. Se sabe que la expresión

de ciertos genes requiere cifras altas de AMP cíclicos, mientras que la expresión de otros genes queda frenada por niveles similares del propio nucleótido. La expresión de los genes relacionados con la activación de los linfocitos se encuentra regulada por un delicado equilibrio entre las cifras intracelulares de AMP cíclicos y de GMP cíclico. (Golub, 1987; Roitt y Brostoff, 1996)

La actividad blastogénica de los linfocitos bajo el estímulo mitogénico permite determinar su estado funcional, lo cual es indispensable para la evaluación de la RIC debido a que éste ensayo de linfoproliferación se utiliza ampliamente en los estudios inmunológicos. (Benjamini et al., 1996)

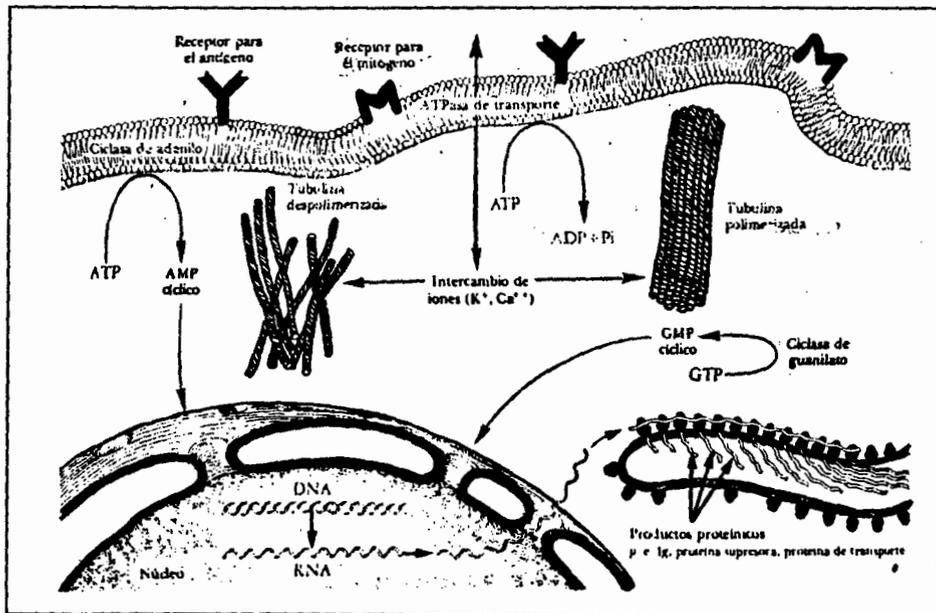


Figura 6. Esquema de los eventos bioquímicos que probablemente acompañan a la activación de los linfocitos a consecuencia de la interacción entre los receptores de superficie de la célula y los mitógenos o los antígenos.

HIPOTESIS

Los linfocitos T del bague de canal (*Ictalurus punctatus*), tratados con péptidos de origen tímico (Tactivina) *in vitro*, restablecen su actividad blastogénica disminuida por el estrés.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto inmunorregulador de la Tactivina *in vitro* en el Ensayo de Transformación Blastoide con linfocitos T del Bagre de Canal (*Ictalurus punctatus*) en presencia de mitógenos, a diferentes temperaturas mediante condiciones de estrés.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **E**valuar la inferencia de los mitógenos (PHA y ConA), en el Ensayo de Linfoproliferación del bage de canal (*Ictalurus punctatus*).
- **E**xaminar la influencia de la temperatura sobre la actividad blastogénica de los linfocitos T del bage de canal, activados con mitógenos (PHA y ConA).
- **A**nalizar el influjo del estrés en la respuesta proliferativa de los linfocitos T del bage de canal, con la estimulación mitogénica seleccionada bajo la temperatura óptima *in vitro*.
- **D**eterminar el efecto *in vitro* de la Tactivina en la actividad blastogénica de los linfocitos T del bage de canal (*Ictalurus punctatus*), bajo condiciones de estrés.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron hembras de bagre de canal ó pez gato (*Ictalurus punctatus*), de 7 meses con talla mínima comercial, de 20 a 25 cm., con un peso de 250 a 350 g, de las granjas acuícolas de la región Ciénega del estado de Jalisco.

MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó RPMI-1640 (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chem. Co. R-6504), suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 5%.

OBTENCION DE LINFOCITOS ESPLENICOS DEL BAGRE DE CANAL

Los peces fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el bazo en condiciones estériles, este órgano linfoide fue colocado en una caja de Petri, con 15 ml de solución salina balanceada de Hank's (SSBH) a 4° C, posteriormente se disgrego en una bolsa de Nitex (malla de microfilamentos de nylon con poros de diámetro de 210 μ , Teteco. Inc., Elmsford, N. Y.), esto se realizó en campana de flujo laminar (Alder). La separación de linfocitos B y T se realizó por medio de la adición al nylon y al vidrio, los linfocitos B tienden a aglutinarse. Posteriormente con una pipeta Pasteur, la suspensión de células de la caja de Petri se colocó en tubos de ensayo de 12X75 mm, donde se dejó reposar por 5 minutos, a temperatura de 4 a 6° C, para que sedimentara los restos tisulares. Las células se centrifugaron a 1,200-1,500 rpm durante 10-15 min. El sobrenadante se eliminó y las células se lavarón dos veces en SSBH. Este procedimiento se realizó dos veces.

TRANSFORMACION BLASTOIDE

El botón celular obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640, de está suspensión celular se diluyó 1:2 para realizar la prueba de viabilidad de los linfocitos, la cual se determinó por medio de la exclusión del colorante azul de tripano al 0.4% (Sigma Chem. Co. T 8154), con el conteo de células en la cámara de Neubauer.

Posteriormente se sembraron en un volumen de 0.1 ml de está suspensión celular, 2×10^5 linfocitos por pozo (○), los cuales se realizaron por triplicado en cajas de cultivo (de 96 pozos con volumen 0.37 ml., Corning Glass Works, 25861. New York 14831) adicionandoles:

- 1.- ○ + 0.1 ml de RPMI-1640 (no estimuladas).
- 2.- ○ + 0.1 ml de mitógeno [PHA (Sigma Chem. Co. L9132) ó Con A (Sigma Chem. Co. C5275)] en diversas concentraciones sobre una base logarítmica (1, 10, 100 µg/ml).

Se incubó (estufa CO₂, Model 302, NAPCO E series) un cultivo por cada temperatura (15, 20, 27 y 32° C), en una atmósfera de 5% de CO₂ y de 95% aire durante 48 horas. Al término de este tiempo se pulsó con 1 µCi de [methyl - ³H] Thymidine (Amersham, 37 Mbq/ml), a cada pozo. Los cultivos se incubaron nuevamente por 24 horas.

Nota: Los bagres de canal *in vivo* estuvieron 24 horas en la misma temperatura que *in vitro*.

COSECHA DE LOS CULTIVOS

Después de 72 horas de incubación se retiraron de la microplaca de cultivo las células de cada pozo, las cuales se resuspendieron por agitación con una pipeta Pasteur, colocada en el pipeteador automático (Drummond). Las células de cada pozo se depositaron en rectángulos de papel filtro del No. 2 de 3 X 2 cm. Cuando las células estuvieron adheridas y los papeles secos, se lavaron dos veces por inmersión en ácido tricloroacético (J. T. Baker Analyzed, 0414-01) al 70%, en agitación constante por 5 minutos. Después se lavaron 2 veces en agitación constante, por inmersión en alcohol (metanol) al 70%. Se dejaron secar y se recortaron en pequeños trozos uniformes y se colocaron en viales. A cada vial se le adicionó 3 ml de líquido de centelleo [PPO 2-5 difenil oxazol (Sigma Chem. Co. D-4630), trítón X100 (Sigma Chem. Co. 6517), etilenglicol (J.T. Baker Analyzed 21766), etanol absoluto (Merck UN1177WGKO) y xilol (Sigma Chem. Co. 917)]. Posteriormente se colocaron en el contador de centelleo de radiaciones β (Beckman, USA LS6000SE), para la medición de la síntesis de DNA

lograda, marcando los cultivos con timidina tritiada ($^3\text{H-Tdr}$), el cual es un precursor de los nucleósidos que se incorporan al DNA recién sintetizado. Los resultados sobre linfoproliferación de la $^3\text{H-Tdr}$ incorporada se expresaron en cuentas por minuto (cpm). La cual es usada como medición estándar de la respuesta linfocitaria, se expreso en base a la **cpm no estimulada** (en los cultivos control) es dividida entre la **cpm estimulada**, lo cual proporciona un cociente referido como el Índice de Estimulación (I.E.). (Jakoby y Pastan, 1979; Morgan y Darling, 1995)

$$\boxed{\text{I.E.}} = \frac{\text{cpm estimulado}}{\text{cpm no estimulado}}$$

Con lo anterior se determinó el mitógeno, la dosis y temperatura óptimos para la transformación blastoide en cultivos de linfocitos de bazo del bagre de canal mediante una curva dosis respuesta.

METODO DE ESTRES POR VARIACION DE TEMPERATURAS

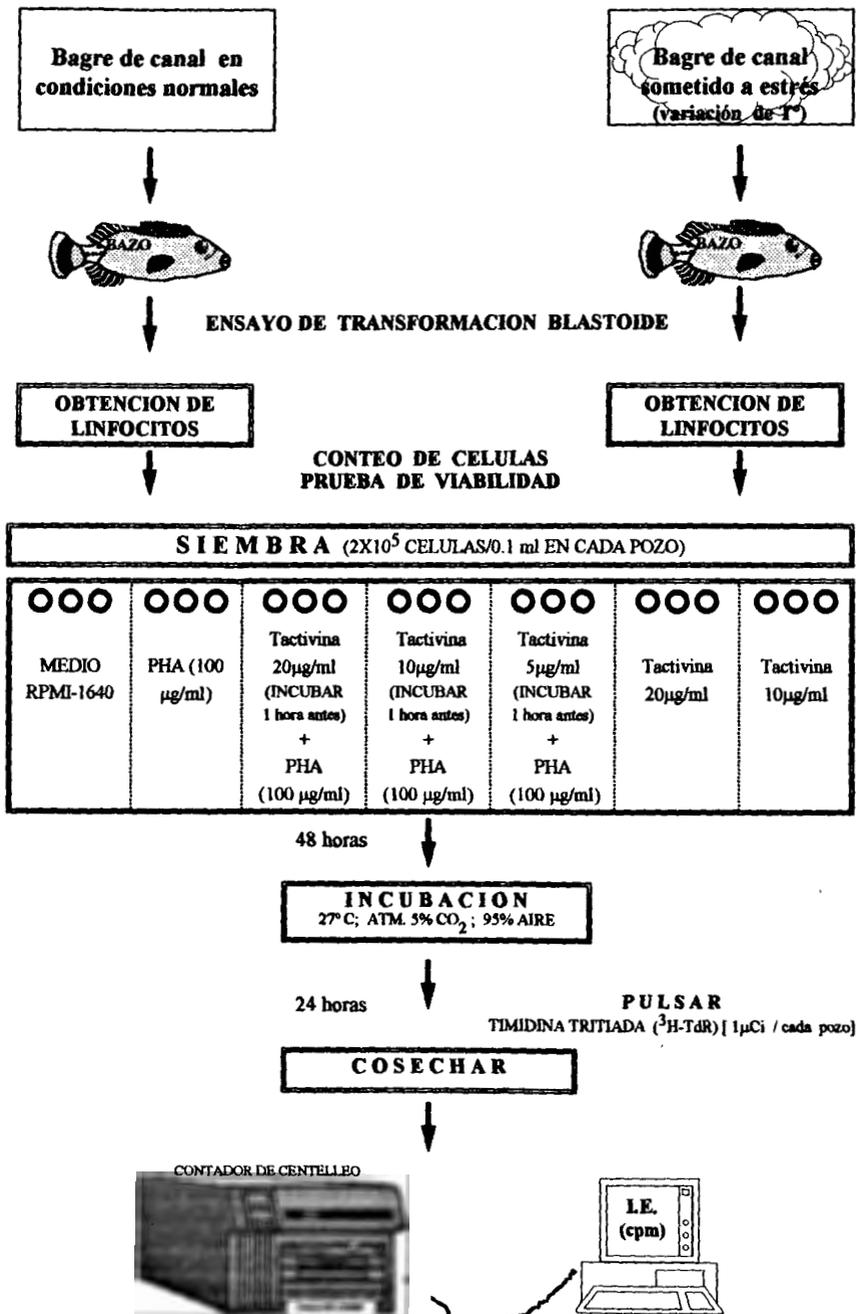
Con la temperatura y el mitógeno óptimas se realizaron los cultivos de linfocitos esplénicos del bagre de canal sometidos a estrés y en condiciones normales, adicionando en cada cultivo diferentes dosis (5,10,20 $\mu\text{g/ml}$) de Tactivina.

Los bagres de canal fueron expuestos en el acuario a una temperatura inicial desde 5° a 15°C durante 35 minutos intercalando un aumento y disminución; de 25° a 35°C . Un intervalo de temperatura de 10°C (Q_{10}) ya que esto provoca que la velocidad de consumo de oxígeno aumente el doble o triple. La sesión de estrés por variables de temperatura fue administrada por 12 horas. (Shu et al., 1993; Schäperclaus et al., 1992) Tanto los bagres en condiciones normales y bajo estrés fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajo el bazo de ambos en las mismas condiciones para ser procesado por medio del ensayo de transformación blastoide.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Este trabajo fue elaborado mediante un diseño factorial de tres factorial y el análisis de los resultados del ensayo de transformación blastoide, reporta un Índice de Estimulación el cual se sometieron a análisis de varianza mediante Statgraphics, obteniendo la significancia estadística. (Montgomery, 1993)

METODOLOGIA



RESULTADOS

Por medio del ensayo de linfoproliferación bajo el estímulo mitogénico se caracterizó el estado funcional de los linfocitos esplénicos del bagre de canal en diferentes temperaturas (32, 27, 20 y 15° C), observando los siguientes resultados:

En temperatura de 32°C, con la dosis de PHA de 1, 10 y 100 µg/ml se observaron los promedios de I.E. de 0.69 ± 0.05 , 1.07 ± 0.06 y 1.99 ± 0.52 respectivamente. Al estimularse los linfocitos con ConA a 32° C los promedios fueron más bajos el promedio de I.E. fue de 0.49 ± 0.03 con la dosis de 1 µg/ml, el promedio de I.E. fue de 0.59 ± 0.04 para la dosis de 10 µg/ml y en la dosis de 100 µg/ml se obtuvo un promedio de I.E. de 0.84 ± 0.04 (Tabla 1).

Cuando se incubó a una temperatura de 27° C, los cultivos de linfocitos estimulados con PHA 100 µg/ml mostraron un promedio de I.E. de 11.07 ± 0.36 más elevado que con PHA 10 µg/ml donde su promedio de I.E. fue de 4.65 ± 0.10 y con PHA 1 µg/ml el promedio de I.E. fue 1.63 ± 0.11 . Los I.E. a esta temperatura presentaron una diferencia significativa con relación a la temperatura de 32° C. Con el mitógeno Con A los linfocitos tuvieron un comportamiento semejante que con la PHA, se observa que la dosis de 100 µg/ml fue la más adecuada para la actividad blastogénica con un promedio de I.E. de 5.09 ± 0.27 , con 10 µg/ml el promedio de I.E. de 2.34 ± 0.04 y a 1 µg/ml de Con A el promedio de I.E. fue 0.97 ± 0.05 (Tabla 2).

Cuando se disminuyó la temperatura a 20°C y se estimularon los linfocitos con PHA y Con A en dosis de 100, 10 y 1 µg/ml de cada uno de los mitógenos se observaron promedios de I.E. de 4.85 ± 0.29 , 2.88 ± 0.30 y 0.99 ± 0.02 respectivamente con el mitógeno PHA a diferencia de Con A donde se presentó una baja linfoproliferación a dosis de 100 µg/ml con un promedio de I.E. de 1.92 ± 0.17 , con 10 µg/ml el promedio de I.E. fue 1.31 ± 0.17 y con dosis de 1 µg/ml el promedio de I.E. fue de 0.86 ± 0.06 (Tabla 3).

En la temperatura de 15°C las células se comportan como las de 32°C, en ambos ensayos los promedios de I.E. fueron muy similares, puesto que las células incubadas a 15°C con PHA 100 µg/ml dieron un promedio de I.E. de 2.13 ± 0.22 , con PHA 10 y 1 µg/ml el promedio de I.E. fue de 1.16 ± 0.03 y de 0.80 ± 0.04 respectivamente, muy similares a los obtenidos con los linfocitos estimulados con ConA a dosis de 100, 10 y 1 µg/ml con los promedios de I.E. fueron de 1.10 ± 0.09 , 0.75 ± 0.03 y 0.58 ± 0.03 respectivamente (Tabla 4).

En la Tabla 5 se observa el promedio de cuentas por minuto (cpm) en los ensayos de transformación blastoide de linfocitos del bage de canal estimulados con PHA y ConA en dosis con disminución logarítmica de 100, 10 y 1 µg/ml y en cada una de las temperaturas (32, 27, 20 y 15° C) de incubación.

En la figura 7 y 9, se observa que los linfocitos estimulados con PHA 100 µg/ml a 27°C alcanza su máxima proliferación (11.07 ± 0.36) de linfocitos esplénicos de bage de canal a diferencia de las concentraciones de 10 µg/ml y 1 µg/ml en donde el promedio de I.E. fue de 4.85 ± 0.29 y 1.99 ± 0.52 , respectivamente.

Cuando los bagres de canal fueron sometidos a desafíos de estrés por variables de temperatura, los linfocitos incubados a temperatura y mitógeno óptimos: 27°C y PHA 100 µg/ml, sin adición de la **Tactivina**, mostraron el promedio del I.E. de 5.07 ± 0.20 , es decir disminuye la linfoproliferación en comparación con los controles de peces no estresados ó en condición normal las cuales reportan un promedio de I.E. de 11.32 ± 0.10 (Figura 16, 18)

Al someter los peces a estrés y aplicarles el inmunomodulador **Tactivina** *in vitro*, observamos que el promedio de I.E. a una dosis de **Tactivina** de 20 µg/ml fue de 25.85 ± 0.39 , a diferencia de los cultivos tratados con **Tactivina** de 10 µg/ml, donde el promedio de I.E. fue 7.03 ± 0.38 y con una dosis de 5 µg/ml de **Tactivina**, el promedio de I.E. fue 3.51 ± 0.38 , no logrando normalizar la RIC ante el estímulo mitogénico. Cuando los linfocitos esplénicos de bage de canal fueron tratados con **Tactivina** sin el estímulo mitogénico en condiciones normales a una dosis de **Tactivina** 20 µg/ml y 10 µg/ml tuvieron un promedio de I.E. de 11.66 ± 0.38 y 5.65 ± 0.03 , respectivamente (Figura 17).

En la Tabla 8 se observa el promedio de cuentas por minuto (cpm) en los ensayos de transformación blastoide de linfocitos del bage de canal en condiciones normal y de estrés, estimulados con PHA 100 µg/ml y tratados previamente con **Tactivina** en dosis de 20, 10 y 5 µg/ml a una temperatura de incubación de 27° C.

Tabla 1. Indices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide del bagre de canal estimulados con PHA y ConA en dosis logarítmica, a una temperatura de 32°C.

MITOGENOS TEMPERATURA	PHA 100 µg/ml	PHA 10 µg/ml	PHA 1 µg/ml	ConA 100 µg/ml	ConA 10 µg/ml	ConA 1 µg/ml
	32° C	1.44	1.04	0.67	0.82	0.61
2.62		1.13	0.77	0.87	0.63	0.52
2.35		0.99	0.65	0.88	0.57	0.47
2.20		1.08	0.66	0.88	0.53	0.49
2.52		1.11	0.72	0.74	0.60	0.46
1.64				0.85		
1.13				0.81		
2.39				0.84		
2.40				0.89		
1.17				0.84		
PROMEDIO X Indice de Estimulación I.E.	1.97±0.52	1.07±0.06	0.69±0.05	0.84±0.05	0.59±0.04	0.49±0.03

Tabla 2. Indices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos del bagre de canal estimulados con PHA y ConA en dosis logarítmica, a una temperatura de 27°C.

MITOGENOS TEMPERATURA	PHA 100 µg/ml	PHA 10 µg/ml	PHA 1 µg/ml	ConA 100 µg/ml	ConA 10 µg/ml	ConA 1 µg/ml
	27° C	10.76	4.46	1.67	4.81	2.38
11.24		4.65	1.50	5.31	2.33	0.92
10.72		4.75	1.52	5.21	2.34	0.97
11.46		4.72	1.79	4.91	2.29	1.02
10.93		4.61	1.58	5.30	2.30	0.99
11.38		4.68	1.69	5.28	2.37	1.00
10.85				4.89		
10.63				4.83		
10.62				5.35		
11.41				5.05		
10.77						
11.30						
11.49						
11.40						
11.12						
PROMEDIO X Indice de Estimulación I.E.		11.07±0.36	4.65±0.10	1.63±0.11	5.09±0.27	2.34±0.04

Tabla 3. Índices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos de bage de canal estimulados con PHA y ConA en dosis logarítmica, a una temperatura de 20°C.

MITOGENOS TEMPERATURA	PHA	PHA	PHA	ConA	ConA	ConA
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
20° C	4.27	3.17	0.98	2.01	1.53	0.88
	5.08	3.10	1.00	1.71	1.17	0.87
	4.90	2.47	0.99	1.74	1.29	0.92
	5.12	2.66	0.97	1.96	1.14	0.76
	4.76	2.98	1.01	1.92	1.42	0.89
	4.58			1.98		
	4.83			2.15		
	4.67			1.69		
	5.12			1.87		
	5.21			2.17		
PROMEDIO X Índice de Estimulación I.E.	4.85±0.30	2.88±0.30	0.99±0.02	1.92±0.17	1.31±0.17	0.86±0.06

Tabla 4. Índices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos de bage de canal estimulados con PHA y ConA en dosis logarítmica, a una temperatura de 15°C.

MITOGENOS TEMPERATURA	PHA	PHA	PHA	ConA	ConA	ConA	
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	
15° C	2.04	1.13	0.76	0.96	0.75	0.56	
	1.92	1.20	0.77	0.99	0.79	0.62	
	2.31	1.16	0.81	1.11	0.71	0.58	
	2.40	1.14	0.83	1.15	0.73	0.55	
	2.00	1.17	0.84	1.13	0.78	0.58	
	1.88			0.96			
	1.98			1.14			
	2.00			1.18			
	2.40			1.19			
	2.39			1.16			
	PROMEDIO X Índice de Estimulación I.E.	2.13±0.22	1.16±0.03	0.80±0.04	1.10±0.09	0.75±0.03	0.58±0.03

Tabla 5. Promedio de cuentas por minuto (cpm) en ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos del bagre de canal estimulados con PHA y ConA.

TEMPERATURA	cpm	MEDIO	PHA 100 µg/ml	PHA 10 µg/ml	PHA 1 µg/ml	ConA 100 µg/ml	ConA 10 µg/ml	ConA 1 µg/ml
	32° C	1094.30±154.75 n = 10	2052.38±488.21 n = 10	1139.40±112.28 n = 5	735.60±78.31 n = 5	937.17±142.43 n = 10	645.20±82.03 n = 5	530.80±67.16 n = 5
27° C	1059.94±189.20 n = 15	11715.97±1961.29 n = 15	4545.83±534.94 n = 6	1611.67±136.60 n = 6	5263.10±931.22 n = 10	2301.67±272.92 n = 6	939.86±95.79 n = 6	
20° C	1126.82±273.82 n = 10	5235.40±1429.63 n = 10	3412.60±404.10 n = 5	1153.80±374.49 n = 5	2134.93±745.02 n = 10	1682.36±604.06 n = 5	1009.00±356.75 n = 5	
15° C	945.62±91.45 n = 10	2183.79±281.89 n = 10	1094.33±130.99 n = 5	762.50±54.47 n = 5	1062.86±128.68 n = 10	707.33±83.09 n = 5	544.00±70.72 n = 5	

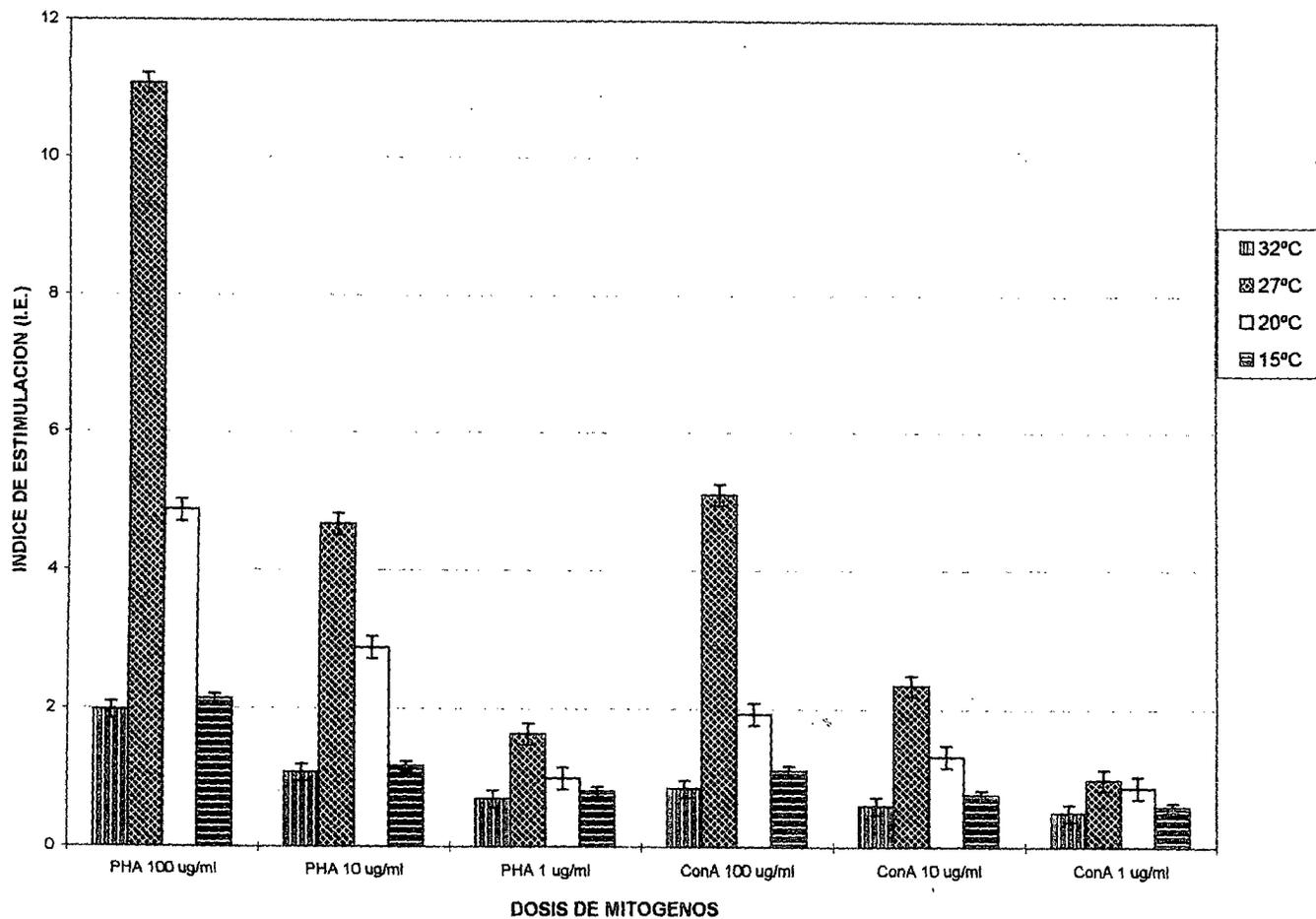


Figura 7. Promedio de los I.E. de Linfoproliferación del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), estimulados con mitógenos (PHA, ConA)

PHA vs ConA

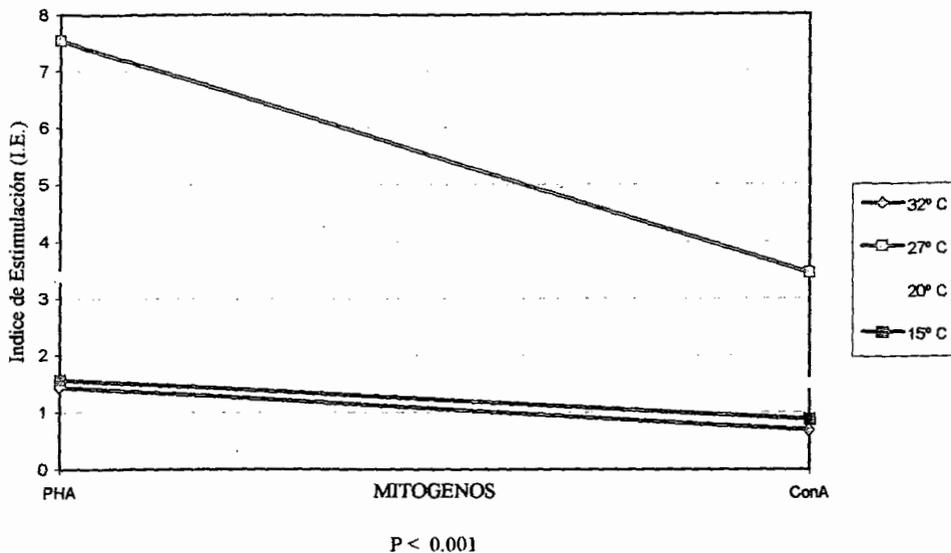


Figura 8. Promedio de los I.E. de transformación blastoide de los linfocitos del bagre de canal, estimulados con mitógenos independientemente de la dosis, a diferentes temperaturas.

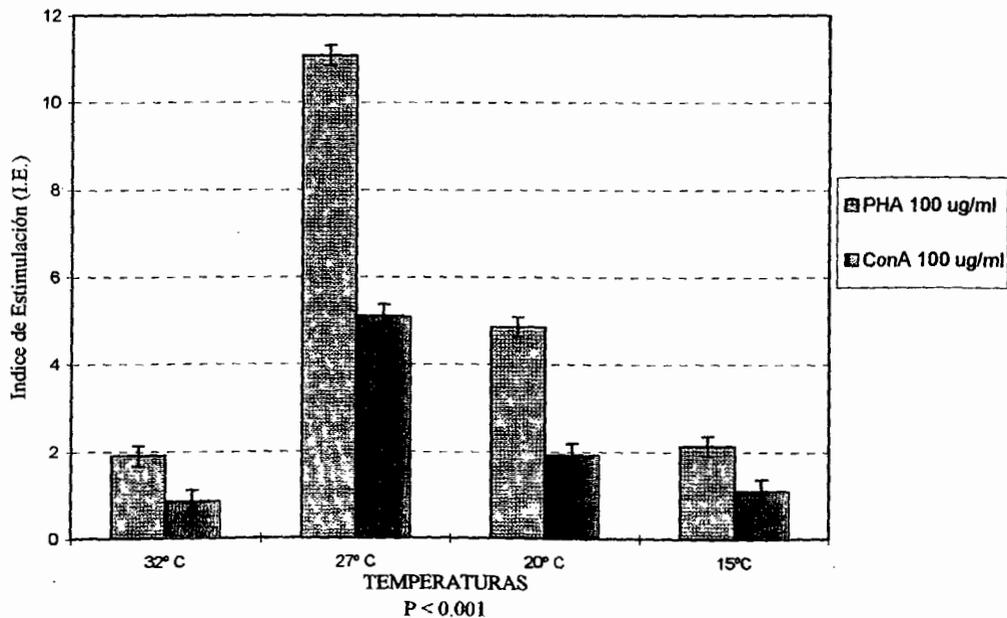


Figura 9. Promedio de los I.E. de Linfoproliferación del bagre de canal, estimulados con PHA 100 ug/ml y ConA 100 ug/ml a diferentes temperaturas.

NIVELES DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA ENTRE LOS I.E. DE TRANSFORMACION BLASTOIDE DE LINFOCITOS ESPLENICOS DE BAGRE DE CANAL ESTIMULADOS CON PHA 100 $\mu\text{g/ml}$ INCUBADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura 18° C vs 32° C

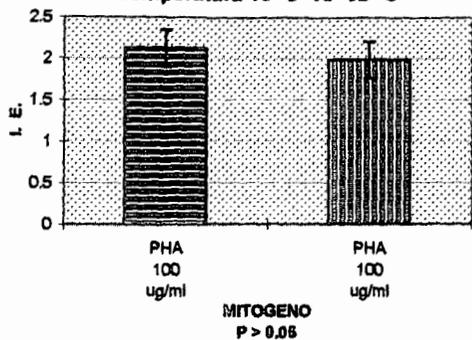


Figura 10

Temperatura 15° C vs 27° C

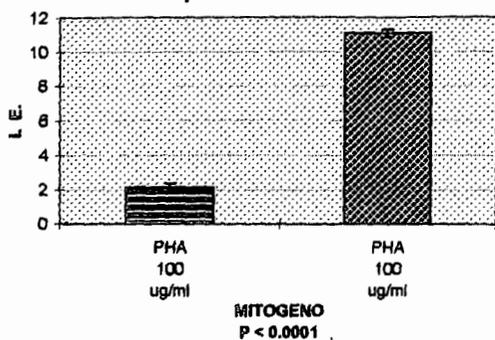


Figura 11

Temperatura 15° C vs 20° C

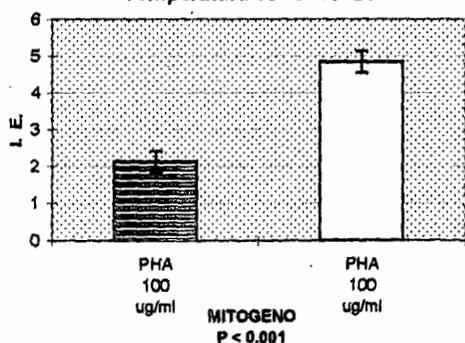


Figura 12

Temperatura 20° C vs 32° C

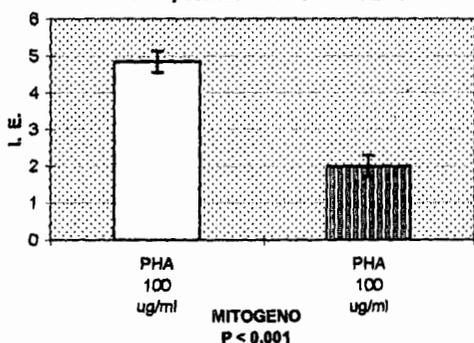


Figura 13

Temperatura 20° C vs 27° C

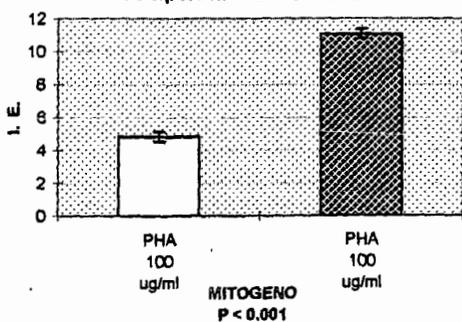


Figura 14

Temperatura 32° C vs 27° C

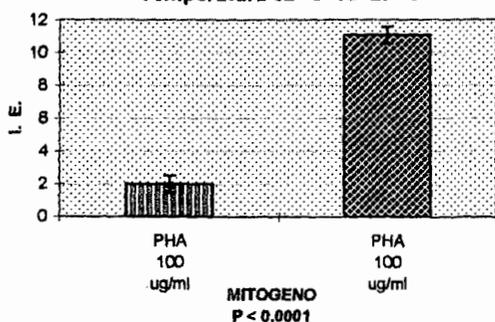


Figura 15

Tabla 6. Indices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos de bagre de canal estimulados con PHA 100 µg/ml a una temperatura de 27° C en presencia de Tactivina.

CONDICION	I.E.	PHA 100 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 20 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 10 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 5 µg/ml	Tactivina 20 µg/ml	Tactivina 10 µg/ml
	N O R M A L		11.30	12.18	10.88	7.83	10.16
		11.24	12.28	10.06	7.29	10.03	8.18
		11.49	11.97	9.93	7.02	9.84	8.16
		11.33	12.12	10.24	7.39		
		11.32	12.15	10.36	7.37		
PROMEDIO X Indice de Estimulación I.E.		11.32±0.10	12.14±0.11	10.29±0.37	7.38±0.29	10.01±0.16	8.36±0.23

Tabla 7. Indices de Estimulación (I.E.) de cada ensayo de transformación blastoide de linfocitos esplénicos de bagre de canal estimulados con PHA 100 µg/ml a una temperatura de 27° C en presencia de Tactivina y bajo condiciones de estrés.

CONDICION	I.E.	PHA 100 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 20 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 10 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 5 µg/ml	Tactivina 20 µg/ml	Tactivina 10 µg/ml
	E S T R E S		5.13	25.56	6.34	2.64	11.76
		5.04	26.50	7.02	3.38	11.89	5.69
		4.59	26.01	7.49	3.34	11.60	5.64
		5.20	26.32	6.64	3.85	11.52	
		5.22	25.91	7.39	3.88	11.53	
		5.10	25.30	7.41	3.76		
		5.24	25.50	6.89	3.69		
		5.18	25.48	7.29	3.82		
		4.91	26.09	7.04	3.29		
		5.11	25.81	6.75	3.41		
PROMEDIO X Indice de Estimulación I.E.		5.07±0.20	25.85±0.39	7.03±0.38	3.51±0.38	11.66±0.16	5.65±0.03

Tabla 8. Promedio de cuentas por minuto (cpm) de transformación blastoide de linfocitos esplénicos del bage de canal estimulados con PHA 100 µg/ml a temperatura de 27°C en presencia de Tactivina.

CONDICION \ cpm	MEDIO	PHA 100 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 20 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 10 µg/ml	PHA 100 µg/ml + Tactivina 5 µg/ml	Tactivina 20 µg/ml	Tactivina 10 µg/ml
NORMAL	1100.17±68.631 n = 5	12483.83±697.62 n = 5	13367.50±738.54 n = 5	11338.00±956.44 n = 5	8135.50±748.98 n = 5	11019.33±651.59 n = 3	9540.83±71.01 n = 3
ESTRES	702.05±107.46 n = 10	3569.81±621.38 n = 10	18567.32±2494.39 n = 10	4784.65±993.22 n = 10	2401.12±665.59 n = 10	8592.10±967.72 n = 5	4326.17±377.09 n = 3

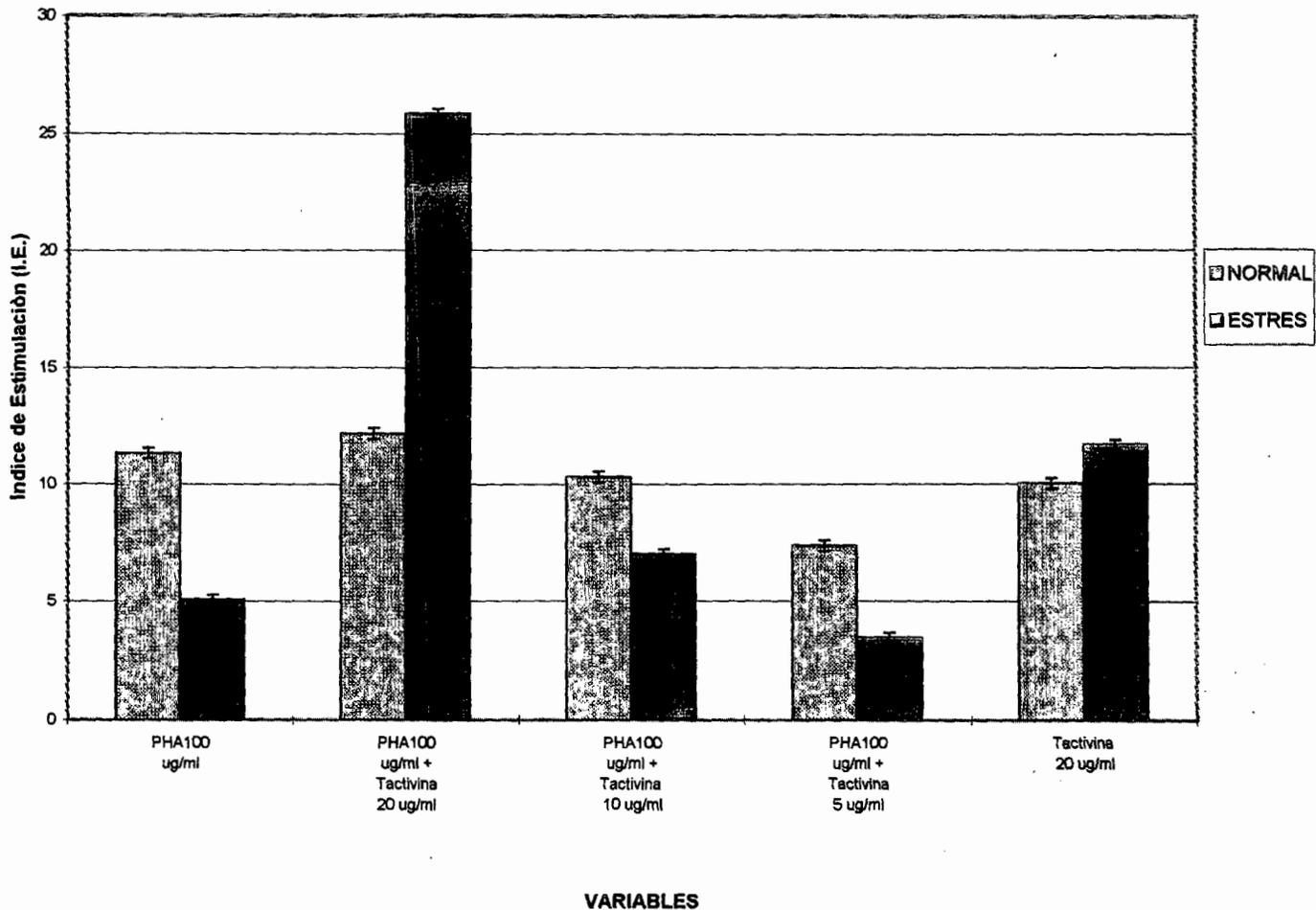


Figura 16. Promedio de los I.E. de transformación blastoide de linfocitos esplénicos del bagre de canal estimulados con PHA 100 ug/ml a temperatura de 27° C en presencia de Tactivina.

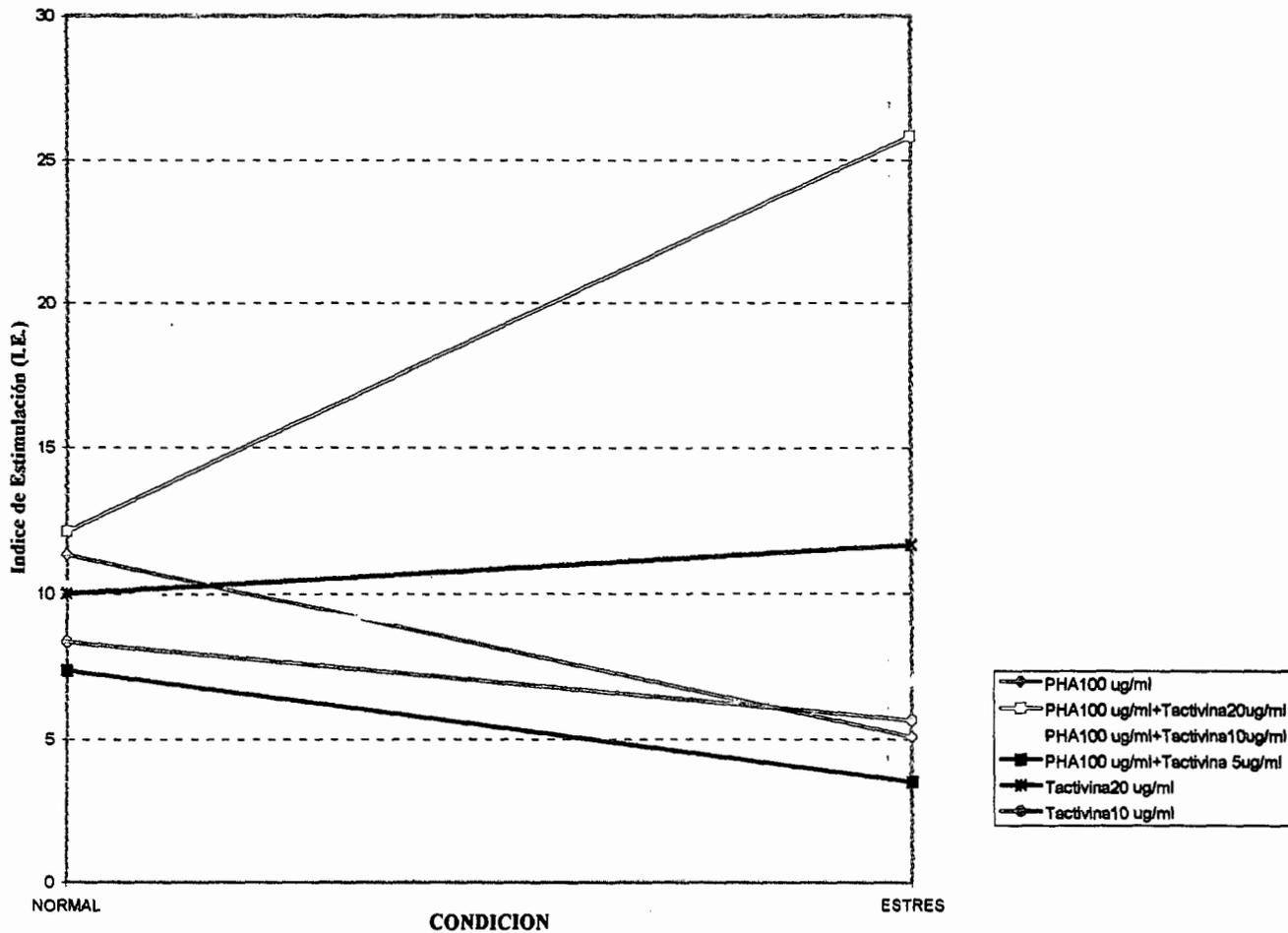


Figura 17. I.E. de los linfocitos de bagre de canal estimulados con PHA 100 ug/ml y tratados previamente con Tactivina en diferentes condiciones.

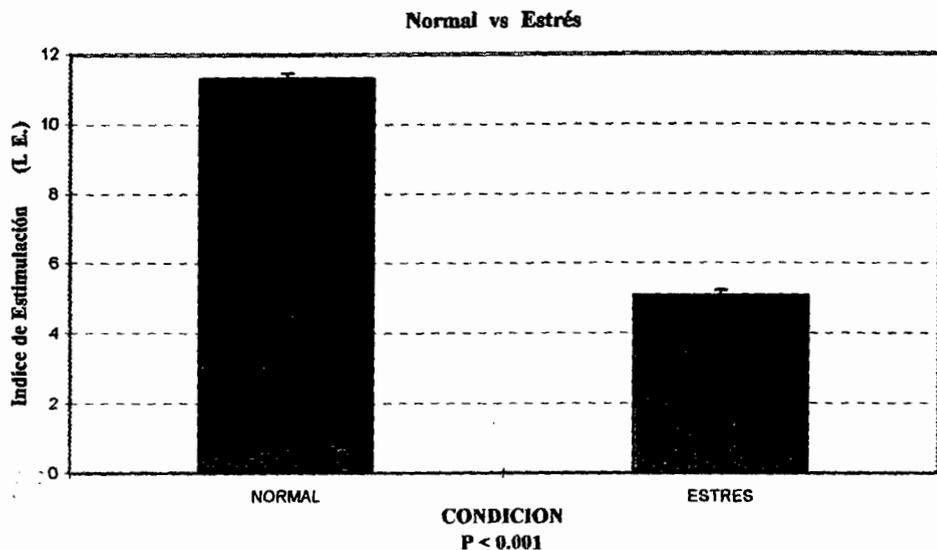


Figura 18. I.E. de los linfocitos del bague de canal, estimulados con PHA 100 ug/ml a temperatura de 27° C en diferentes condiciones.

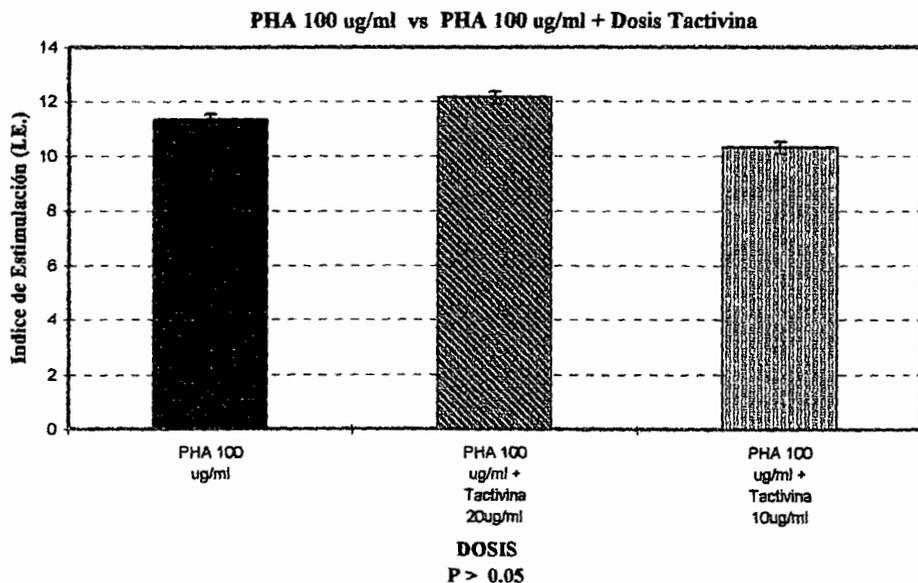


Figura 19. I.E. de los linfocitos de bague de canal estimulados con PHA 100 ug/ml y tratados previamente con Tactivina en condición normal.

PHA 100 ug/ml vs PHA 100 ug/ml + Tactivina 5 ug/ml

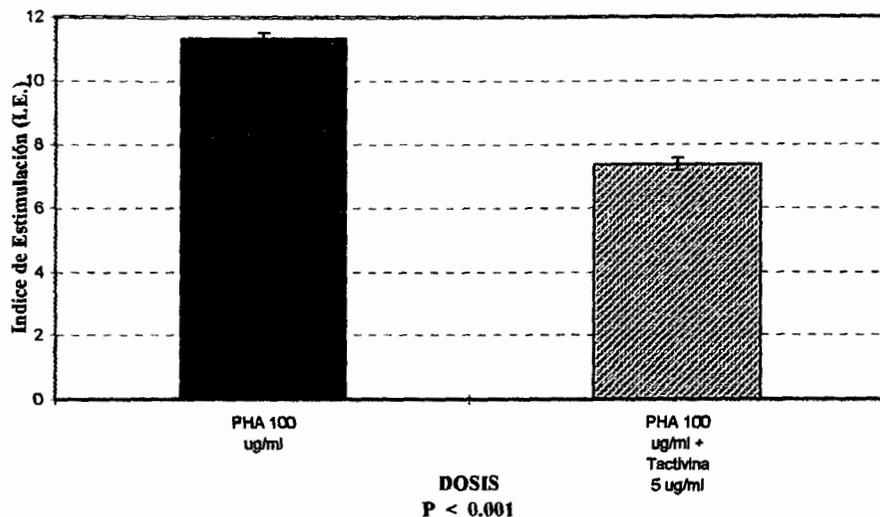


Figura 20. I.E. de los linfocitos del bage de canal, estimulados con PHA 100 ug/ml y tratados previamente con Tactivina a temperatura de 27° C en condición normal.

PHA 100 ug/ml vs PHA 100 ug/ml + Tactivina 5 ug/ml

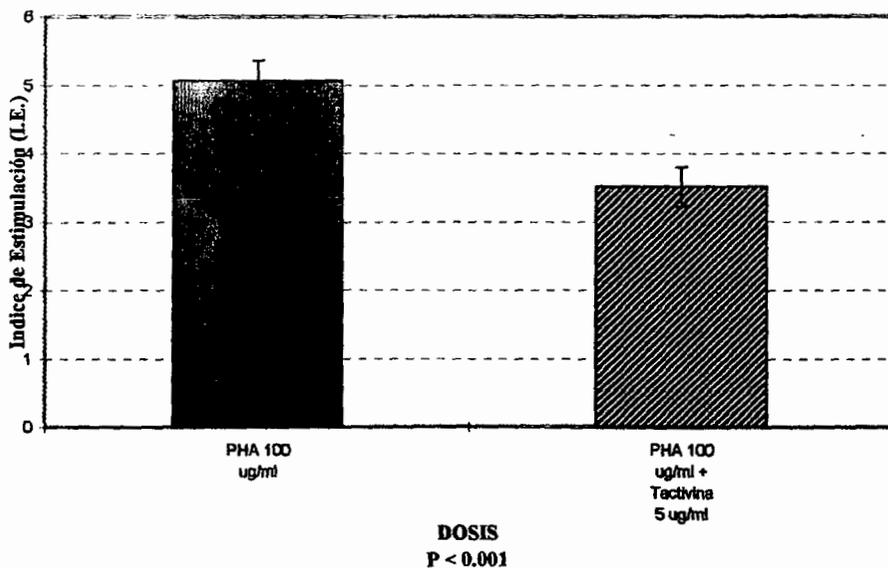


Figura 21. I.E. de los linfocitos del bage de canal, estimulados con PHA 100 ug/ml y tratados previamente con Tactivina a temperatura de 27° C en condiciones de estrés.

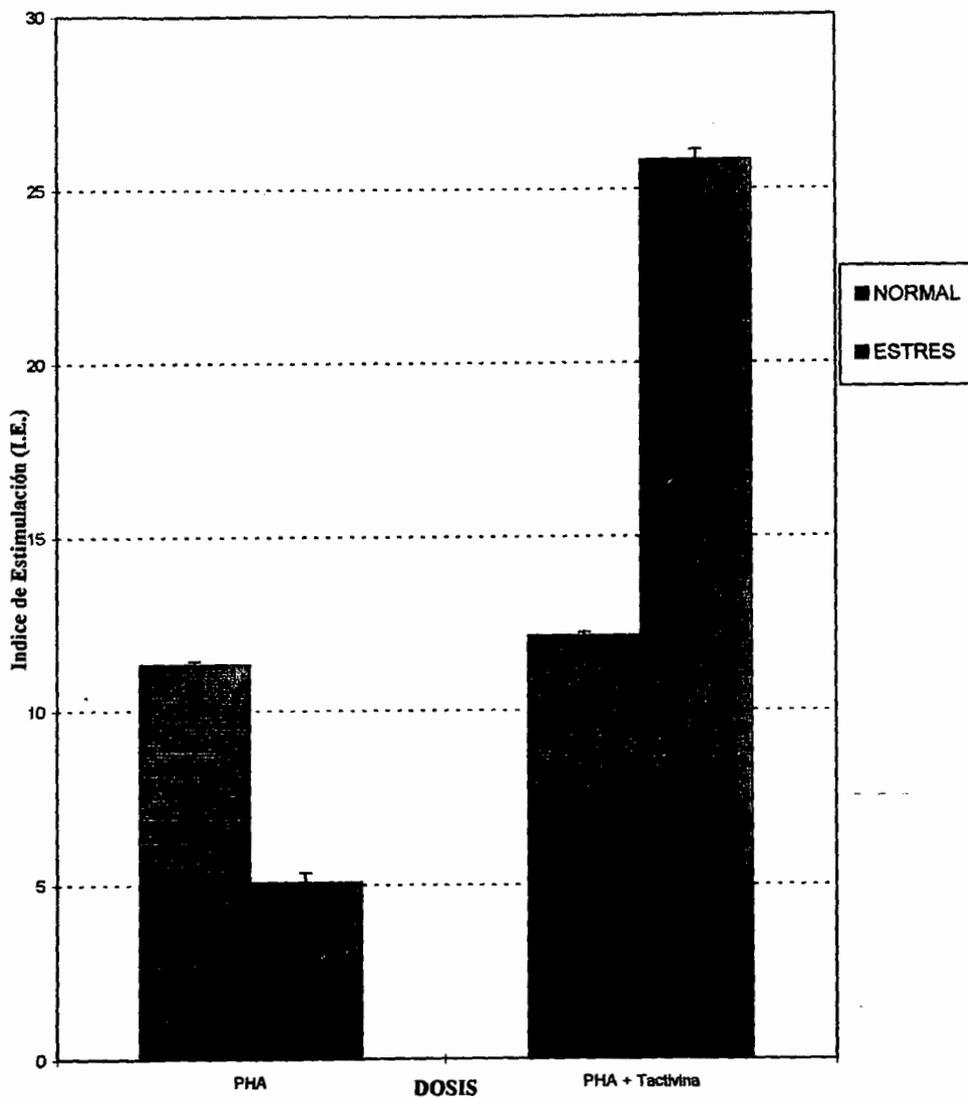


Figura 22. I.E. de los linfocitos del bage de canal, estimulados con PHA 100 ug/ml y tratados previamente con Tactivina 20 ug/ml a temperatura de 27° C en diferentes condiciones.



BIBLIOTECA CENTRAL

Tal como se menciona en los antecedentes, la temperatura es un factor ambiental importante en la modificación de la RI en los animales ectotérmicos (Cone, 1972; Sereno, 1979), pero en los peces existen muy pocos trabajos al respecto, la mayoría de ellos se refieren principalmente a la investigación de la producción de anticuerpos (Bisset, 1948; Bly, 1992) y fagocitosis (Jerald, 1991). En el presente trabajo se analizó el efecto de la temperatura sobre la proliferación de linfocitos del bage de canal, encontrando que la temperatura óptima fue 27° C en todos los cultivos, independientemente del tipo de mitógeno y su dosis (ver Fig. 8). Esta temperatura coincide con la temperatura óptima que se requiere para el desarrollo embrionario adecuado de la freza (huevecillos) del bage de canal (Bardach, 1982) y, además, a los 27° C se observa la función máxima de fagocitos del bage de canal (Ainsworth, 1991). Por lo que podemos suponer, que la temperatura de 27° C es la mejor para el metabolismo celular del bage de canal en general y para la RIC en particular.

En los cultivos linfocitarios incubados a las temperaturas extremas (15 y 32 °C) para el bage de canal, observamos los niveles más bajos de I.E. con la PHA y con la ConA, aún con la dosis óptima de 100 µg/ml en ambos mitógenos (ver la Fig. 7). Lo que coincide con los datos, reportados por Ainsworth y col., los cuales observaron a una temperatura baja de 17° C la supresión de la respuesta fagocitaria *in vitro* en el bage de canal, así como en otras especies de peces de aguas templadas. Bly y Clem en 1991, también muestran una disminución de células cooperadoras en el bage de canal inducida por la temperatura baja de 11° C y la producción reducida de anticuerpos en la respuesta inmune secundaria. Estos datos permiten la conclusión de una influencia determinante de la temperatura en el crecimiento celular, probablemente a través del cambio en la actividad enzimática intracelular, la cual se reduce en las temperaturas extremas (bajas o elevadas) (Jakoby, 1979), dando como resultado una baja respuesta.

Estos datos de la investigación básica pueden tener la aplicación práctica a través de la optimización de los esquemas de vacunación en los peces. En nuestro caso recomendamos realizar la inmunización en el bagre de canal en primavera-verano, cuando la temperatura del agua es óptima para la respuesta inmune y se puede mejorar los resultados de las medidas profilácticas con el fin de incrementar la resistencia a las enfermedades infecciosas y así elevar la producción en la acuicultura.

Con relación a los mitógenos, se observó una mayor linfoproliferación con la PHA que con la ConA en todas las concentraciones (100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$) independientemente de la temperatura del cultivo celular (ver la Fig. 9). Desconocemos el mecanismo que puede explicar éste fenómeno, sin embargo, la N - acetil - Dgalactosamina presente en el receptor de las células T y al cual se une la PHA, debe tener una K (constante de afinidad) más grande que la K de afinidad de los manopiranosidos implicados en la unión de la ConA y el receptor de las células T (Barrete, 1990). Tomando en cuenta lo anterior podemos suponer que la PHA actúa de modo similar en los linfocitos del bagre, que en el ratón o humano.

Respecto a la dosis del mitógeno, observamos mayor I.E. en los linfocitos estimulados con la concentración más elevada (100 $\mu\text{g/ml}$) en ambos casos, independientemente de la temperatura (ver la Fig. 7 a la 15). Los datos existentes en la literatura sobre la dosis óptima del mitógeno en el ensayo de linfoproliferación para las distintas especies reportadas por diferentes autores son muy diversos y varían entre 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Por lo que en cada estudio respectivo debe realizarse la estandarización de dicho parámetro metodológico. Los linfocitos del bagre de canal se estimulan con la dosis más elevada (100 $\mu\text{g/ml}$), de mitógeno comparado con los reportados en otros animales, por ejemplo, del hombre (10 $\mu\text{g/ml}$), lo cual determina una menor sensibilidad de los receptores para la PHA en los peces en comparación con los mamíferos, siendo el bagre de canal un vertebrado menos evolucionado que el hombre.

En cuanto a la diferencia significativa entre los I.E. de los linfocitos del bagre estresado y del bagre en condiciones normales, usando los parámetros óptimos del cultivo celular en ambos casos (Temperatura 27°C, dosis de PHA 100 $\mu\text{g/ml}$), ver Fig. 18, se ha postulado en los últimos 20 años que existe una correlación bidireccional entre el sistema nervioso central y el sistema inmune (Roitt, 1996), el efecto inmunosupresor del estrés sobre la respuesta inmune se atribuye principalmente al aumento de la secreción de glucocorticoides por la estimulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Alvarez, 1992; Stratakis, 1995). Debido a lo anterior, no podemos descartar que uno de los mecanismos involucrados en la disminución

significativa de la actividad blastogénica de los linfocitos del bague estresado es la inmunosupresión por la producción elevada de corticoesteroides. Sin embargo, para poder demostrar esto se requiere de la medición de cortisona o ACTH en el suero del bague estresado. Además Stratakis también menciona la involución temporal del timo y hasta una disminución de masa de los órganos linfoides en el caso de estrés notable, lo que puede ser otro mecanismo involucrado en el fenómeno observado por nosotros.

Por lo anterior decidimos utilizar un extracto tímico Tactivina, *in vitro* con diferentes concentraciones junto con el estímulo mitogénico de la PHA en los cultivos linfocitarios del bague en las condiciones normales y después de someterlo a estrés térmico, obtuvimos datos interesantes:

En primer lugar, no observamos diferencia significativa en los I.E. de los linfocitos de bague en condiciones normales, cultivados solamente con PHA, y de los linfocitos tratados previamente con 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de Tactivina (ver la Fig. 19), lo cual implica que la Tactivina no influye en la respuesta a PHA cuando no hay inmunosupresión en el pez. Lo que coincide con los datos reportados por Arion en 1989; donde se demuestra que la Tactivina no modifica los parámetros normales de linfoproliferación estimulada por la PHA en los ratones y en el hombre. Pero en el caso de los linfocitos tratados con la dosis baja de Tactivina (5 $\mu\text{g/ml}$) previamente a la estimulación con PHA, obtuvimos I.E. significativamente menores en comparación con los linfocitos cultivados solamente con la PHA (ver la Fig. 20). El mismo efecto de ésta dosis de Tactivina observamos en los linfocitos del bague de canal estresado (ver la Fig. 21).

En segundo lugar, tomando en cuenta la heterogeneidad molecular de la Tactivina (tiene 16 polipéptidos) y su heterogeneidad funcional (sus diferentes fracciones muestran distinto comportamiento en diferentes test inmunológicos) que reporta Arion, 1989; podemos conjeturar que la función inhibidora de linfoproliferación que algunos polipéptidos de éste extracto tímico, muestran probablemente se realiza porque a esta dosis no se activan las vías de expresión del gene de la IL-2 (p21Ras, Rac1) cuando no hay saturación de los receptores para dichos polipéptidos.

El mismo autor menciona, que la Tactivina sola, sin PHA, prácticamente no estimula la linfoproliferación en los mamíferos, lo que no concuerda con los datos encontrados en los linfocitos de bague (ver la Tabla 6), donde observamos el efecto mitogénico de la Tactivina, casi similar a la PHA.

A este respecto no contamos con datos que expliquen la estimulación prácticamente mitogénica de linfoproliferación por Tactivina, pero podemos sugerir, que en el bague de canal los receptores de los linfocitos T son estimulados por alguno de

los 16 polipéptidos presentes en la Tactivina. Sin embargo, para poder demostrar esto se requiere de la investigación a nivel molecular de los receptores presentes para los linfocitos del bague y su afinidad hacia diversas fracciones de Tactivina.

Por último, observamos la normalización del I.E. de los linfocitos del bague estresado, tratados solamente con Tactivina a 20 µg/ml y el aumento notable de I.E. de los mismos linfocitos estimulados, además, con la PHA (ver Tabla 7 y Fig. 22).

Desconocemos el mecanismo por el cual la Tactivina restablece la actividad blastogénica de los linfocitos del bague estresado, pero se han reportado su uso como inmunoregulador en condiciones de estrés *in vivo* en los caballos de carrera y en los deportistas después de las competencias. Aunque resulta difícil de explicar estos hechos, lo anterior sugiere que el estado funcional de los linfocitos obtenidos del bague no estresado es diferente al correspondiente del bague estresado. En este punto, se requiere estudiar la producción de citocinas, principalmente IL-2, la expresión de receptores para esta citocina, otras moléculas coestimuladoras y señales de transducción celular en los linfocitos del animal estresado y tratado con Tactivina, porque esta información pudiera aclarar el mecanismo de inmunoregulación de los péptidos que conforman la Tactivina. Finalmente, todos los datos observados en el presente trabajo sugieren que la Tactivina tiene un efecto modulador en la RIC en el bague de canal en condiciones de estrés.

Este efecto, que no había sido reportado, puede ser importante en el tratamiento profiláctico de inmunosupresión por estrés tímico en los peces de cultivo intensivo (por ejemplo, en caso de cambio de piletas de alevines), lo que puede disminuir la pérdida económica, la cual es notable durante dicho manejo.

Sin embargo, para establecer el papel real de la Tactivina en el tratamiento de inmunodeficiencia provocada por el estrés se requiere de contestar las interrogantes que se mencionaron en anterioridad en el contexto de todos los mecanismos inmunoreguladores que se han atribuido a este extracto tímico.

CONCLUSIONES

- 1) PHA fue el mitógeno que causó la máxima respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos del bage de canal.
- 2) La dosis de PHA (100µg/ml) dio el mayor índice de estimulación en los linfocitos esplénicos de bage de canal.
- 3) La temperatura óptima para la proliferación de linfocitos del bazo del bage es de 27° C.
- 4) La actividad blastogénica de los linfocitos esplénicos del bage de canal bajo la temperatura óptima de 27° C, se disminuye más del 50 % en los peces estresados.
- 5) La dosis de Tactivina de 20 µg/ml incrementa significativamente el índice de estimulación en el ensayo de proliferación de linfocitos del bage estresado con cambios de temperatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBAS, A.K.**; Licntman, A.H., and Pober, J.S. 1994. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company 2da. Edición. Philadelphia, Pennsylvania.
- AINSWORTH, A.J.**; Dexiang, C.; Waterstrat, P.R. and Greenway, T. 1991. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10° C. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 100 A, 4: 907-918.
- ALBERTS, B.**; Bray, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, D. 1994. Molecula Biology of the Cell. Third Edition. Ed. Garland.
- ALVAREZ, M.** y Garcia, J. 1992. Desarrollo de la respuesta del sistema inmune. Ediciones Omega.
- ARION, V. YA.** 1989. Physicochemical aspects of medicine reviews. Thymic Peptides as Immunoregulators with Special Reference to Tactivin. Harwood Academic Publishers, Moscow.
- AVERS C.J.** 1983. Biología Celular. Editorial Interamericana. New York.
- BACH, J.F.**; Pleau, J.M.; Dardenne M. 1980. Polypeptide thymic hormone. Miles International Symposium Seires. Raven Press. New York. 12: 489-499.
- BARDACH, E.J.**; Ryther, H.J. 1982. Acuacultura Crianza y Cultivo de Organismos marinos y de agua dulce. AGT Editor. México, D.F.
- BARRETE, T.J.** 1990. Inmunología Médica. Editorial Interamericana, Mc. Graw-Hill. Quinta Edición. México, D.F.
- BENJAMINI, E.**; Sunkhire, G. and Leskowitz, S. 1996. Immunology a short course. Third Edition. Wiley-Liss. New York.
- BLAZER, V.S.**; Bennett, R.O., and Wolke, R.E. 1984. The cellular immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to sheep red blood cells. Dev. Com. Immunol. 8: 81-87.
- BLY, J.E.**; Clem, L.W. 1991. Temperature-mediated processes in teleost immunity: In vivo Low temperature immunsation does not induce tolerance in channel catfish. Fish Shellfish Immunol. 1: 229-231.
- BLY, J.E.** and Clem, L.W. 1992. Temperature and teleost immune functions. Fish Shellfish Immunol. 2: 159-171.
- BOGNER, K.H.** and Ellis, A.E. 1977. Propiedades y funciones de los linfocitos y tejidos linfoides de los peces teleósteos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- CASTELLAN W.G.** 1986. Físicoquímica. Addison-Wesley Iberoamericana. México, D.F. 440-450.

- CONE, R.E.; Marchalonis, J.J. 1972. Cellular and Humoral aspects of the influence of environmental temperature on the immune response of poikilothermic vertebrates. *J. Immunol.* **108** (4): 952-957.
- ELLIS, A.E. 1989. The immunology of teleosts. In *Fish Pathology*. Baillière Tindal. London. 135-152.
- ELLSAESSER, C.F.; Bly, J.E. and Clem, L.W. 1988. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity the thymus of the channel catfish. *Dev. Com. Immunol.* **12**: 787-799.
- ETLINGER, H.M.; Hodgins, H.O. & Chiller, J.M. 1976. Evolution of the lymphoid system. I. evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.* **116**: 1547-1553.
- FAULMAN, E.; Cuchens, M.A.; Lobb, C.J.; Miller, N.W.; Clem, L.W. 1983. An effective culture system for studying in vitro mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **112**: 673-679.
- FUDA, H.; Harat, A.; Yamazaki, F.; Kobayashi, K. 1992. A peculiar Immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum Salmon (*Oncorhynchus keta*). *Dev. Com. Immunol.* University, Sapporo Hokkaido. Japan: **16**: 415-423.
- GOLUB, E.S. 1987. Base Celular de la Respuesta Inmunológica. Editorial Reverté, S.A.
- GOMEZ, O.G. 1993. Identificación de bacterias patógenas en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) y carpa común (*Cyprinus carpio*) en granjas acuícolas del estado de Jalisco. CUCBA. Universidad de Guadalajara.
- HARDIE, L.J.; Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1994. Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev. Com. Immunol.* **18**: 57-66.
- HAYMAN, J.R.; Lobb, C.J. 1993. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Com. Immunol.* **17**: 241-248.
- HEINZ H., Reichenbach K. 1982. Enfermedades de los Peces. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- HILL, R.W. 1980. Fisiología Animal Comparada, un enfoque ambiental. Editorial Reverté. Barcelona. 35-158.
- HOUGHTON, G.; Healey, L. J., & Matthews T. 1992. The cellular proliferative response, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetramyena pyriformis* will *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile. *Dev. Com. Immunol.* **16**: 301-312.
- JAKOBY, W.B. and Pastan, I.H. 1979. Cell Culture. Methods in Enzymology. Academic Press. Inc. San Diego, California. 466-477.
- KINKELIN, P.; Michel, Ch.; Grittino, P. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Capítulo Inmunología. Editorial Acribia, S.A. España.
- LAGLER, K.F.; Bardach, J.E.; Miller, R.R.; Passino, D.R.M. 1990. Ictiología. Agt Editor S.A. México, D.F.
- MILLER, N.W. and Clem, L.W. 1984. Mycrosystem for In Vitro Primary and Secondary Immunization of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Leukocytes with Hapten-Carrier Conjugates. *J. Immunol. Meth.* **72**: 367-379.
- MONGOMERY, D.C. 1993. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Interamericana. México, D.F.
- MORGAN S.J.; Darling D.C. 1995. Cultivo de Celulas Animales. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- OJEDA P.P., Rodríguez L. 1989. Manual Técnico para el cultivo del bagre. Fonfepesca.
- OKIMURA, T.; Satomi-Sasaki, Y.; Ohkuma, S. 1994. Stress and immune responses. II. Identification of stress-sensitive cells in murine spleen cells. *Japón. Pharmacol.* **40**: 513- 526.

- RIJKERS, G.T.**; Elizabeth, M.H.; Frederix-Wolters & Van Muiswinkel W. B. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol.* **41**: 91-97.
- RIJKERS, G.T.** 1981. Introduction to fish immunology. *Dev. Com. Immunol.* **5**: 527-534.
- ROBERTS, R.J.** 1989. *Fish Pathology*. 2nd edn. Baillière Tindall, London.
- ROCHER, M.**; Troutaud, D. and Deschaux, P. 1995. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. *Dev. Com. Immunol.* **87-95**.
- ROITT, M.I.** and Brostoff, J. 1996. *Immunology*. 4th. Edition. Academic Press. London.
- ROITT, M.I.**, Delves J.P. 1992. *Encyclopedia of Immunology*. Volume one. Academic Press. London.
- SAKAI, D.K.** 1992. Immunological Defense Mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.* **2**: 223-247.
- SALGADO, U.I.H.** 1992. El analisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y Aplicaciones. Escuela Nacional de Estudios Profesionales. Universidad N. Autónoma de México.
- SCHÄPERCLAUS, W.**; Kulow, H.; Schrecrenbach, K. 1992. *Fish Diseases Vol. 1 y Vol. 2*. (1st corrected, revised and substantially enlarged edition). A.A. Balkema/Rotterdam.
- SECRETARIA de Pesca.** 1988. Manual técnico para el cultivo de Bagre de Canal. FONDEPESCA, 1era. Edición. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- SERENO, M.** and Avtalion, R.R. 1979. Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity in ectothermic vertebrates. Establishment of immunological suppression in fish. *Dev. Com. Immunol.* **2**: 87-94.
- SHU, J.**; Stevenson, R., and Zhou, X. 1993. Modulation of cellular immune responses by cold water swim stress in the rat. *Dev. Com. Immunol.* **17**: 357-371.
- SIMA, P.**; Vetricka, V. 1993. Evolution of Immune Reactions. *CRC Crit. Rev. Environ. Control.* **13** (2): 83-114.
- STITES, D.P.**; Stobo, J.D.; y Wells, J.V. 1988. *Inmunología Básica y Clínica*. Editorial El Manual Médico, S.A. México, D.F.
- STRATAKIS, C.A.** and Chrousos, G.P. 1995. *Neuroendocrinology and Pathophysiology of the stress system*. Washington. 2-15.
- TIZARD, I.** 1989. *Inmunología Veterinaria*. Editorial Interamericana, Mc. Graw-Hill. México, D.F.
- TURNER J.R.** 1994. *Immunology a Comparative Approach*. John Wiley & Sons. England. 69-92.
- URSIN, H.** 1994. Stress, distress and immunity. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **741**: 204-211.
- VALLEJO, A.N.**; Miller, N.W.; Harvey, N.E.; Cuchens, M.A.; Warr's, G.W., & Clem, L.W. 1992. Cellular Pathway(s) of antigen processing and presentation in fish APC: Endosomal Involvement and Cell-Free Antigen Presentation. *Dev. Immunol.* **13**: 51-65.
- VALLEJO, A.N.**; Miller, N.W., and Clem L.W. 1992. Cellular pathway(s) of antigen processing in fish APC: Effect of varying in vitro temperatures on antigen catabolism. *Dev. Com. Immunol.* **16**: 367-381.
- VAN MUISWINKEL, W.B.**; Lamers, C.H.J. and Rombout, J.H.W.M. 1991. Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res. Immunol.* **142**: 362-366.

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADP	Difosfato de Adenosina
Ag	Antígeno
Ala	Alanina
AMP	Monofosfato de Adenosina
APC	Células presentadoras de antígeno
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
ATP	Trifosfato de Adenosina
C'3	Molécula activadora del complemento C3
Ca	Calcio
CD	Determinantes Agregados (por sus siglas en ingles: Cluster of Differentiation)
CD3	Grupo de Diferenciación 3. Molécula asociada al receptor del antígeno (TCR)
cGTP	Trifosfato de Guanosina ciclico
°C	Grados Centígrados
Ci	Curie
cm	Centímetro
CO2	Dióxido de Carbono
ConA	Concanavalina A
cpm	Cuentas por minuto
Cys	Cisteína
Fc	Fragmento carboxilico
Fig.	Figura
FTS	Factor Tímico del Suero
g	Gramo
Gln	Glutamina
Glu	Acido glutámico

Gly	Glicocola
GMP	Monofosfato de Guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
3H-Tdr	Timidina Tritiada
HRBC	Inyección Intraperitoneal de Eritrocitos de Caballo
I.E.	Indice de Estimulación
IFN	Interferón
IFN-α	Interferón alfa
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodalton
Lys	Lisina
μ	Micro
MAF	Factor Activador de Macrófago
MALT	Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas
Mg	Magnesio
μg	Microgramo
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIF	Factor de Inhibición de la Migración de Macrófagos
ml	Militro
mm³	Milimetro cúbico
Nk	Células asesinas naturales
PCR	Proteína C Reactiva
pH	Potencial de Hidrógeno o concentración de iones de Hidrógeno
PHA	Fitohemaglutinina
ppm	Partes por Millón
RFC	Células Formadoras de Rosetas
RIC	Respuesta Inmune Celular
rIL-2	Receptor de la IL-2
RNA	Acido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute
RTF	Receptor a Transferrina
Ser	Serina
SFB	Suero Fetal de Bovino
SI	Sistema Inmune

SNC	Sistema Nervioso Central
SSBH	Solución Salina Balanceada de Hank's
Tc	Célula T citotóxica
Tf	Transferrina
TH	Célula T cooperadora
THFγ-2	Factor Humoral Tímico
Thy1	Antígeno presente en las células T murinas
Ts	Célula T supresora
Tyr	Tirosina
Val	Valina

Derechos reservados. No se podrá reproducir o utilizar cualquier parte de este trabajo en ninguna forma, ya sea electrónica, mecánica, fotográfica o de otra índole sin permiso del autor. ISBN 968-13-1288-7 Copyright ©, 1997