

18.
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO DE CELULAS AISLADAS DE LA BURSA DE FABRICIUS: EFECTO DE ANDROGENOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :

PATRICIA GUADALUPE CANDELARIA SILVA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTA CATALINA ROMANO PARDO



México, D.F.



1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Cultivo de células aisladas de la Bursa de Fabricius: Efecto de andrógenos.

realizado por Patricia Guadalupe Candelaria Silva

con número de cuenta 7405717-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dra. Marta Catalina Romano Pardo
Propietario Dra. María Eugenia Gonzebatt Bonaparte
Propietario M. en IBB Saúl Cano Colín
Suplente M. en C. Silvia Devars Ramos
Suplente M. en C. Francisco Javier Camacho Arroyo

[Handwritten signatures]
Saúl Cano Colín
Alma Dávila

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIAS

A mi madre,

ya que sin su apoyo, comprensión y amor no hubiera llegado a esta meta.

A la memoria de mi padre,

porque se que este momento de mi vida le hubiera gozado tanto como yo.

A mis hermanos,

Carlos, Ely, Ceci, Laura y Julio por ser como son y formar parte de esta familia tan suigeneris pero a la vez tan padre.

A los monstruos marinos,

Juan y Pablo con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Romano toda la paciencia que me tuvo para la finalización de este trabajo tanto a nivel profesional como personal.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que de una u otra manera me han apoyado en esta etapa de mi vida, en especial, a Malú, Dolores, Ivone, Alicia, Gloria, Macrina, Claudia, Mario.

A Carolina por haberme enseñado las bases para hacer los cultivos.

A Ignacio Araoz por la realización de las figuras que aparecen en la tesis.

A los técnicos del laboratorio Armando y Jesús por su cooperación en lo que respecta a la disponibilidad de material y equipo de laboratorio.

A Luz Ma. Buendía por su apoyo secretarial

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 SISTEMA INMUNE	1
1.1.1 <i>Tipos de Inmunidad Especifica</i>	2
1.1.2 <i>Fases de la Respuesta Inmune Especifica</i>	4
1.1.3 <i>Células del sistema inmune</i>	5
1.1.4 <i>Relación Neuroinmunoendocrina</i>	10
1.2 BURSA DE FABRICIUS	12
1.2.1 MORFOLOGIA	13
1.2.2 DESARROLLO	14
1.2.3 CRECIMIENTO	16
1.2.4 RELACION CON TESTICULOS	16
2. JUSTIFICACION	21
3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
5. METODOLOGIA	24
5.1 CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE BURSA DE FABRICIUS	24
5.2 SUSTRATOS	26
5.3 TRATAMIENTO DEL CULTIVO CON ANDROGENOS	27
5.4 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	29
6. RESULTADOS	30
6.1 MORFOLOGIA DEL CULTIVO	30
6.2 TIPO DE SUSTRATO	34
6.3 EFFECTO DE LA APLICACION DE ANDROGENOS	43
6.3.1 <i>Cuantificación de proteínas</i>	51
7. DISCUSION	53
8. CONCLUSIONES	59
9. BIBLIOGRAFIA	60

1. INTRODUCCION

1.1 SISTEMA INMUNE

Un organismo (vertebrado) se protege contra los microorganismos y componentes extraños ajenos a su cuerpo por medio de diferentes mecanismos (Tabla 1), los cuales incluyen las barreras físicas, las células fagocíticas y los eosinófilos de la sangre y de los tejidos, una subpoblación de linfocitos llamados células destructoras naturales (NK, del inglés natural killer) y diversas moléculas transportadas en la sangre, todos los cuales participan en la tarea de reconocer lo propio de lo extraño y que, de esta manera, el individuo pueda defenderse. Todos estos mecanismos están presentes en el cuerpo y antes de la primera exposición a los microorganismos infecciosos u otras macromoléculas extrañas, no aumentan por tales exposiciones y no discriminan entre la mayor parte de las sustancias extrañas: son los componentes de la **inmunidad natural**. Otros mecanismos de defensa son inducidos o estimulados por la exposición a sustancias extrañas, son específicos para distintas macromoléculas y aumentan en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular: estos mecanismos constituyen la **inmunidad adquirida o específica**.

Las sustancias extrañas que inducen una inmunidad específica se llaman **antígenos**.

	Natural	Específica (adquirida)
Barreras Físicoquímicas.	Piel, mucosas.	Sistemas inmunitarios cutáneo y mucoso; anticuerpos en las secreciones mucosas.
Moléculas Circulantes.	Complemento.	Anticuerpos.
Células.	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), células destructoras naturales.	Linfocitos.
Mediadores solubles activos en otras células.	Citocinas derivadas de macrófagos: interferones α y β , factor de necrosis tumoral	Citocinas derivadas de linfocitos: interferón γ

Tabla 1. Características de la inmunidad natural y específica (tomado de Abbas, A.K. et al. 1995.)

1.1.1 Tipos de Inmunidad Específica

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos tipos, en función de los componentes del sistema inmunitario que median dichas respuestas. (Fig. 1)

1. La **inmunidad humoral** está mediada por los **linfocitos B** que responden a antígenos extraños transformándose en células productoras de anticuerpos. Este tipo de inmunidad es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y las toxinas que secretan, ya que los anticuerpos pueden unirse a ellos y cooperar en su destrucción. Pueden transferirse a individuos que no han sido

expuestos al antígeno (no inmunizados) por medio de componentes no celulares de la sangre, esto es, el plasma o el suero.

2. La **inmunidad mediada por células**, también llamada **inmunidad celular**, está mediada por células llamadas **linfocitos T** que activan a los macrófagos para que destruyan a los microorganismos intracelulares o eliminen a las células infectadas por virus. Puede transferirse a otros individuos con células procedentes de individuos inmunizados, pero no con plasma o suero.

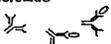
	INMUNIDAD HUMORAL	INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS	
ANTIGENO	 Bacteria extracelular	 Microorganismos intracelulares en el macrófago	 Microorganismos intracelulares duplicándose
LINFOCITOS RESPONDEDORES	 LINFOCITO B	 LINFOCITO T	 LINFOCITO T
MECANISMOS EFECTORES	Anticuerpo secretado  Eliminación de las bacterias	 Activación del macrófago, muerte del microorganismo	 Lisis de la célula infectada
TRANSFERIDO POR:	Suero (anticuerpos)	Linfocitos	Linfocitos

Figura 1. Formas de Inmunidad Específica (tomado de Abbas A.K. et al. 1995.).

1.1.2 Fases de la Respuesta Inmune Específica

Todas las respuestas inmunes se inician con el reconocimiento de los antígenos extraños. Esto conduce a la activación de los linfocitos que reconocen específicamente el antígeno, y culmina en el desarrollo de mecanismos que median el efecto fisiológico de la respuesta, principalmente la eliminación del antígeno. Por lo tanto, esta respuesta puede dividirse en: **Fase de reconocimiento**, que consiste en la unión de los antígenos extraños a los receptores específicos situados sobre los linfocitos maduros; **Fase de activación**, que es la secuencia de acontecimientos inducida en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento del antígeno específico. Todos los linfocitos sufren dos importantes cambios en respuesta a los antígenos: primero proliferan, lo que lleva a la expansión de los clones de linfocitos específicos para el antígeno y a la amplificación de la respuesta protectora y segundo los linfocitos se transforman desde células cuya función básica es de reconocimiento a células que actúan eliminando antígenos extraños y por último la) **Fase efectora**, que es la fase donde los linfocitos (denominados efectores) que han sido activados de forma específica por los antígenos realizan las funciones que llevan a su eliminación. Muchas funciones efectoras precisan la participación de otras células no linfoides (a las que también se denomina a menudo “células efectoras”) y de mecanismos de defensa que son también operativos en la inmunidad natural. (Figura 2).

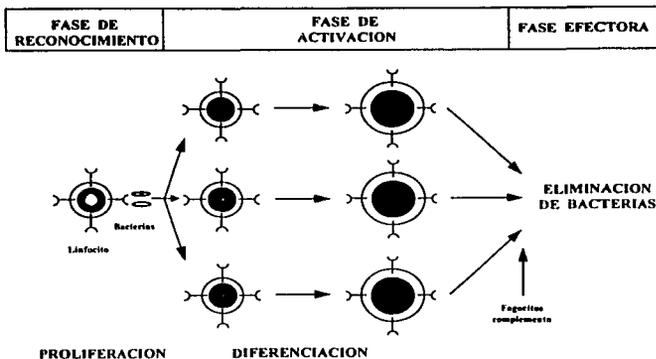


Figura 2. Fases de la Respuesta Específica (tomado de Abbas, A.K. et al. 1995.)

1.1.3 Células del sistema inmune

Las células del sistema inmunológico están presentes normalmente como células circulantes en la sangre y linfa, como grupos anatómicamente definidos y como células dispersas en casi todos los tejidos excepto en el sistema nervioso central.

Los **linfocitos** son las células que reconocen y responden de forma específica a los antígenos extraños. Sin embargo, las fases de reconocimiento y de activación de la respuesta inmune dependen de células linfoides, llamadas células **acesorias**, como

las células dendríticas, etc. La activación de los linfocitos conduce a la generación de numerosos mecanismos efectoros. Muchos de estos mecanismos efectoros necesitan de la actividad de las **células efectoras**, como los fagocitos mononucleares y otros leucocitos.

Como todas las células sanguíneas, los linfocitos se originan en la médula ósea. En las fases iniciales de su desarrollo, los linfocitos no producen receptores de superficie para los antígenos y, por lo tanto, no responden frente a los mismos. A medida que maduran, comienzan a expresar receptores a antígenos, se convierten en células capaces de responder a la estimulación antigénica y se transforman a diferentes subclases funcionales.

Los linfocitos se pueden clasificar en dos grandes grupos, los linfocitos “B” y “T” que difieren en el lugar donde maduran, en sus funciones y productos protéicos.

Los **linfocitos B**, son llamados así porque en las aves se vió, inicialmente, que maduraban en un órgano denominado *bursa de Fabricius*. En los mamíferos no hay un equivalente anatómico de esta bolsa, y los primeros estadios de maduración de la célula B ocurren en la médula ósea. Durante la vida embrionaria de los mamíferos las células B emergen del bazo y del hígado y en los adultos, la médula ósea es la principal fuente de células B, de las células destructoras naturales y de

todas las otras células sanguíneas excepto las células T, las cuales se producen en el timo (Figura 3).

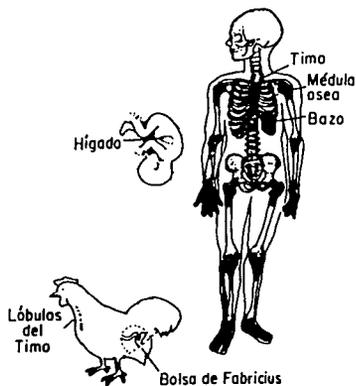


Figura 3. Sitios de Formación de los Linfocitos (tomado de Paul, W.E. 1993.)

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Los receptores para antígeno de los linfocitos B son formas de anticuerpos unidas a la membrana. La interacción de los antígenos con estos anticuerpos de membrana inicia la secuencia de activación de la célula B, que culmina en el desarrollo de células efectoras que secretan activamente anticuerpos.

Por otra parte se encuentran los **linfocitos T**, cuya maduración ocurre en el timo. Se dividen, a su vez, en subpoblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las **células T cooperadoras (CD_4^+)** y las **células T citolíticas (CD_8^+)**. Los linfocitos T no producen anticuerpos. Sus receptores de antígeno son moléculas de membrana diferentes, aunque estructuralmente relacionadas con los anticuerpos. En respuesta a la estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan factores llamados citocinas, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células T, así como de otras células, incluidas las células B y los macrófagos. Los linfocitos T citolíticos lisan a las células que producen antígenos extraños, como aquellas infectadas por virus y microorganismos intracelulares.

Otro tipo importante de linfocitos está constituido por las **células destructoras naturales (Natural killer)**, que no expresan marcadores de células T ni B y son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos capaces de lisar diferentes células tumorales o infectadas por virus, sin una estimulación antigénica clara (Figura 4).

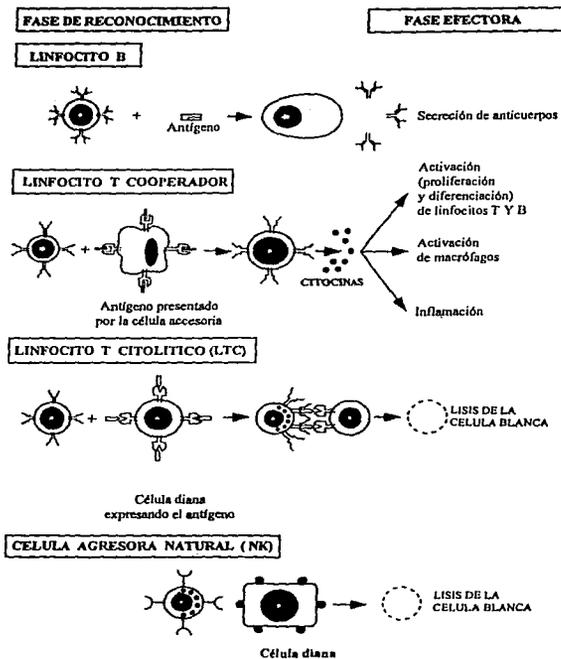


Figura 4. Clases de Linfocitos (tomado de Abbas, A.K., et al. 1995.)

1.1.4 Relación Neuroinmunoendocrina

En los últimos años, el interés sobre la función del sistema inmune se ha incrementado. Se ha hecho evidente que el sistema inmune interactúa con la gran mayoría, si no es que con todos los sistemas del cuerpo (Figura 5). El sistema inmune, al igual que el sistema nervioso y el endocrino, juegan un papel importante en la adaptación biológica, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis y al establecimiento de la integridad corporal. Su función es eliminar a los patógenos que provocan daños en el huésped. Por otro lado, es crucial para el organismo que exista una modulación fina del sistema inmune, ya que una respuesta no controlada puede conducir a enfermedades autoinmunes, alergias, hipersensibilidad y anafilaxis, mientras que su supresión puede facilitar el ataque de enfermedades infecciosas oportunistas y procesos neoplásicos

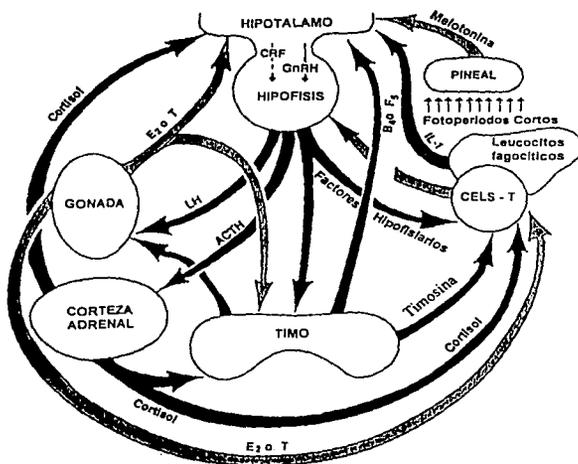


Figura 5. Interacción Neuroinmunoendocrina (tomado de Grossman C.J. et al.1991).
 E₂ = estradiol, T = testosterona, GnRH = hormona liberadora de gonadotropinas,
 CRF = factor liberador de corticotropinas, LH = hormona luteinizante, IL-1 =
 interleucina 1, ACTH = hormona adrenocorticotrópica, B₄ = timosina β₄, F₅ =
 fracción 5 de timosina.

1.2 BURSA DE FABRICIUS

La *bursa de Fabricius* fue descrita por Hieronymus Fabricius en 1621, es un órgano inmunológico linfoepitelial presente en las aves, responsable de la producción de anticuerpos humorales (Glick et al, 1956; Mueller et al., 1962; Graetzer et al., 1963; Cooper et al., 1965), que se desarrolla como una bolsa hueca entre la columna vertebral y la parte posterior del intestino grueso, se encuentra en la zona dorsal de la cloaca y está conectada a la luz del intestino (Fig 6).

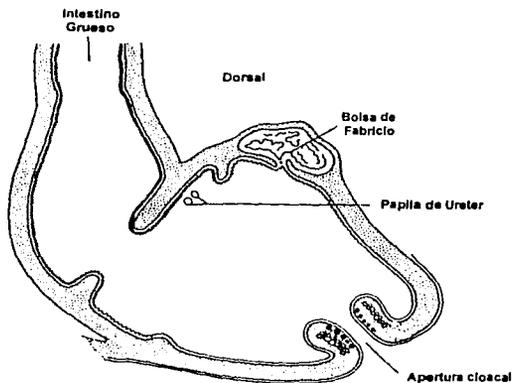


Figura 6. Esquema de un corte longitudinal de la cloaca (tomado de Marshall A.J., 1960.).

No fue sino hasta 1956 que Glick y col. describieron el papel de la bursa de Fabricius en el desarrollo de la inmunidad humoral en las aves. Cuando ellos removían la bursa durante la primera semana de desarrollo se producía una disminución o eliminación en la producción de anticuerpos contra *Salmonella typhimurium*. En 1960, Mueller y col. confirmaron y extendieron estas observaciones.

1.2.1 MORFOLOGIA

La histogénesis de la bursa es el resultado del desarrollo coordinado de tres componentes: el epitelio, de origen endodérmico, el mesénquima proveniente del mesodermo y las células madre hemopoyéticas que invaden la bursa durante el desarrollo embrionario. Las interacciones entre endodermo y mesodermo son fundamentales para que se lleve a cabo la nidación de las células hemopoyéticas con la consiguiente formación de los folículos linfoides característicos de la bursa (Le Douarin and Houssaint, 1975; Houssaint et al, 1976).

La superficie luminal de la bursa presenta numerosos pliegues en los cuales se encuentran los folículos bursales. La superficie de estos pliegues presenta dos tipos distintos de células epiteliales: el epitelio folicular, el cual recubre los folículo

bursales, y el epitelio interfolicular que está densamente cubierto de microvellosidades.

En el epitelio folicular se pueden identificar dos unidades morfológicamente separadas: una unidad linfocítica medular, aislada de los elementos del tejido vascular y conjuntivo, en contacto con el lumen de la bursa y una unidad extramedular que posee los tejidos remanentes de la bursa, incluyendo los canales vasculares. Se ha propuesto que solamente la unidad linfocítica medular es la que tiene capacidad endocrina. También se ha calculado que la bursa del pollo posee entre 8,000 y 12,000 folículos.

1.2.2 DESARROLLO

El desarrollo de la bursa se puede dividir en tres etapas: 1) la formación del precursor de la bursa, 2) la formación de los folículos linfoides y 3) la maduración de los folículos.

A los 4-5 días de incubación de los embriones de pollo aparece el precursor de la bursa, como un grupo de vesículas en el mesénquima, las cuales se ubican entre la membrana urodeal ininterrumpida y el epitelio cloacal. Las vesículas gradualmente se unen y la cavidad formada se comunica con la cavidad cloacal, aproximadamente a los 10 días. Alrededor del día 12 se puede observar que los brotes epiteliales

comienzan a proyectarse en el tejido mesenquimatoso, dentro de los pliegues. Las células se anastomosan y forman una malla reticular, la cual se rodea por una membrana basal.

Algunos autores han observado que la infiltración de las primeras células linfoides en los brotes epiteliales se presenta alrededor de los 9-10 días de desarrollo prenatal (Edwards et al, 1975), mientras que otros han reportado que es a partir de los 13-14 días (Eerola, 1980). En el momento de la eclosión aparecen células linfoides en el tejido mesenquimatoso que rodea a los foliculos, en donde se desarrolla la corteza folicular.

Desde el reconocimiento de la naturaleza linfoide de la bursa por Leydig, en 1857, el origen de las células linfoides que contribuyen a la diferenciación de los foliculos es algo controversial. De acuerdo a Jolly (1915), éstas derivan de la transformación de células mesenquimatosas, las cuales invaden el endodermo y ahí se diferencian en linfocitos. En contraste, Retterer (1885) sugirió un origen endodermal de las células hemopoyéticas bursales (Houssaint et al., 1976). Otros autores han propuesto que una gran proporción de los linfocitos bursales derivan directamente de la transformación de las células epiteliales alineadas en la superficie de la bursa (Ackerman, 1962; Ackerman y Knouff, 1963).

Las evidencias dadas por Moore y Owen (1966) empleando cromosomas marcados para seguir la migración celular en el desarrollo del sistema hematopoyético en embriones de pollo, junto con las evidencias dadas por Ortega et al. (1965), Edwards et al. (1975) y los estudios con quimeras interespecíficas de Houssaint et al. (1976) han demostrado que antes de que ocurra la transformación linfóide del rudimento bursal, células grandes indiferenciadas con citoplasma basófilo aparecen en los vasos sanguíneos y en el mesénquima. Posteriormente, células similares las cuales han sido consideradas como progenitoras de la población linfóide se localizan en el epitelio.

1.2.3 CRECIMIENTO

La bursa crece rápidamente durante las primeras tres semanas después de la eclosión, entre la 3ª y 8ª semana continua creciendo aunque con un ritmo menor que el crecimiento corporal. Al final de la 8ª semana se inicia un proceso de regresión. La regresión de la bursa puede seguir al período de crecimiento rápido o puede estar precedido por un período de reposo, pero siempre ocurre antes de los 4 meses de edad (dependiendo de la raza de ave con la que se trabaje) (Glick, 1980).

1.2.4 RELACION CON TESTICULOS

Existe una relación muy estrecha entre el crecimiento de la bursa y el crecimiento del testículo. En pollos de poca edad (5-8 semanas) el crecimiento de la bursa es mucho más rápido que el del testículo, de hecho durante estas primeras ocho semanas el testículo crece muy lentamente. Posteriormente, a medida que la bursa comienza a involucionar, se observa que el tamaño del testículo se incrementa rápidamente, presenta un crecimiento acelerado a partir de la octava semana que continua hasta la semana 23. Es decir, existe una relación directa entre la involución de la bursa y la madurez sexual (Glick, 1956, 1960a; Wolfe et al., 1962). Esto permitió sugerir que dicho órgano se encuentra bajo control hormonal y para comprobarlo se llevaron a cabo diferentes estudios sobre el efecto de hormonas esteroideas sobre el desarrollo de la bursa.

Se observó que la inyección de altas dosis de andrógenos a aves jóvenes inducía una considerable reducción de la bursa de Fabricius (Kirkpatrick y Andrews, 1944; Glick, 1955). La inyección de testosterona en huevos de 5 días de incubación provocó una completa ausencia de la bursa en animales recién eclosionados (Meyer et al., 1959; Glick, 1964). Además, se ha observado que la administración de andrógenos durante la formación de folículos en el epitelio (11-12 días de incubación) detiene la evolución de la bursa y por lo tanto la linfopoyesis nunca ocurre; si el

tratamiento hormonal es aplicado después del desarrollo de los folículos linfoides, se observa que éstos desaparecen en pocos días y el epitelio bursal regresa a un estado de indiferenciación, consecuentemente la bursectomía hormonal da como resultado una severa inmunodeficiencia, caracterizada por una ausencia de producción de anticuerpos (Aspinall et al., 1961; Glick and Sadler, 1961; Rao et al., 1962; Warner et al., 1962; Glick et al., 1977; Glick, 1980). Por lo tanto, la capacidad para responder a andrógenos está presente durante todas las etapas de la ontogenia bursal.

A partir de estos estudios surgió la pregunta de cómo los andrógenos podían inhibir el desarrollo bursal. Se ha observado que las interacciones celulares entre los componentes epiteliales y mesenquimatosas de la bursa condicionan la formación de folículos y la colonización por las células madre, ambos procesos necesarios para la diferenciación de los linfocitos (Le Douarin y Houssaint, 1974; Houssaint et al., 1976). En 1980, Le Douarin et al., haciendo experimentos de combinación de tejidos entre endodermo tratado con testosterona y mesénquima normal y viceversa, demostraron que los andrógenos dañan irreversiblemente el epitelio bursal y esto provoca que no haya formación de folículos. Esto ocurre aún si se encuentra asociado al mesénquima bursal no tratado. Por el contrario, la asociación de mesénquima tratado con testosterona con endodermo normal resulta en una histogénesis bursal normal.

Por otro lado, se ha observado que la respuesta de la bursa a las hormonas sexuales depende en gran medida de la dosis de hormona administrada; por ejemplo, se ha observado que el propionato de testosterona y la progesterona administrados en altas dosis inhiben el desarrollo de la bursa, mientras que pequeñas dosis similares a los niveles embrionarios, tienen un efecto estimulador (Norton y Wira, 1977).

Por determinaciones bioquímicas se han encontrado receptores para varios esteroides en la bursa de Fabricius de pollos inmaduros (Sullivan y Wira, 1979). Le Douarin et al. (1980) caracterizaron los receptores a andrógenos en las células endodermales y mesenquimatosas de la bursa; Aranyi y Naray (1980) caracterizaron los receptores a glucocorticoides. Por otro lado, se han localizado por autorradiografía sitios de unión para andrógenos y estrógenos en secciones congeladas de bursa embrionaria de 15 días (Gasc et al., 1979). También se han caracterizado bioquímicamente e inmunocitoquímicamente receptores a progesterona (Ylikomi et al., 1985; Ylikomi, 1986).

La bursectomía realizada en embriones de pollo en las primeras horas del desarrollo (68 hrs. de incubación) provoca cambios en el funcionamiento y morfología del testículo y la suprarrenal (Pedemera et al., 1980; Aguilar et al., 1981), observándose un significativo incremento en el porcentaje de células de Leydig maduras y aumento correlativo de la secreción de testosterona *in vitro* a los

17 días de vida embrionaria y en el momento del nacimiento. Utilizando un modelo *in vitro* se demostró que un factor soluble segregado por la bursa inhibe la respuesta estimulante de la gonadotropina coriónica sobre la secreción de testosterona del testículo de pollo recién nacido, pero no afectó su secreción basal de testosterona (Romano et al., 1981). Por otro lado, King et al. (1985) observaron que un factor bursal es capaz de inhibir la producción de testosterona inducida por hCG en testículos de rata *in vivo* e *in vitro*.

2. JUSTIFICACION

A partir de los estudios de Glick sobre la bursa de Fabricius se han generado varios trabajos tendientes a conocer su fisiología y morfología. Estas investigaciones han permitido establecer la estrecha relación que existe entre su desarrollo y el de las gónadas, en particular con los testículos, ya que la administración temprana de andrógenos impide su desarrollo. Se han caracterizado receptores para testosterona en las células mesenquimatosas y receptores para testosterona, estrógenos, progesterona y glucocorticoides en el epitelio bursal. Le Douarin et al. (1980) observaron en experimentos en los cuales se combinaron endodermo tratado con testosterona y mesénquima normal o viceversa, que los andrógenos dañan irreversiblemente el epitelio bursal. Con base en esto nos propusimos desarrollar un cultivo de células aisladas de bursa de Fabricius de embrión de pollo como un modelo para estudiar *in vitro* los efectos de andrógenos.

Un modelo de este tipo, podría aportar información sobre el desarrollo *in vitro* de las poblaciones celulares que constituyen a la bursa y de los factores que tienen influencia sobre éste.

3. HIPOTESIS

Las células de la bursa de Fabricius podrían cultivarse en monocapa. Este sistema aislado nos permitiría investigar el efecto de hormonas y factores sin la participación de sustancias endógenas provenientes de otros tejidos del organismo completo.

Dado que se han identificado receptores a andrógenos en las diferentes poblaciones celulares de la bursa de Fabricius y que la aplicación de éstos modifican el desarrollo de la misma, se espera que la presencia de diferentes andrógenos en el medio de cultivo de las poblaciones celulares produzca alteraciones morfológicas que indicarían un efecto directo de estas hormonas sobre las células de la bursa.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer y caracterizar un cultivo primario de células provenientes de la bursa de Fabricius de embriones de pollo de 15 días de edad.
- Estudiar en cultivo el efecto de andrógenos sobre el crecimiento de las células bursales.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar un cultivo de células embrionarias de la bursa de Fabricius.
2. Probar diferentes tipos de sustratos: plástico, colágena y poli-l-lisina para crecer las células.
3. Analizar el efecto de testosterona y dihidrotestosterona sobre el crecimiento de las células de la bursa en cultivo primario.
4. Investigar el efecto de testosterona y dihidrotestosterona sobre la concentración de proteínas totales de cultivos de células de la bursa de Fabricius.

5. METODOLOGIA

5.1 CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE BURSA DE FABRICIUS

Se utilizaron embriones de pollo de la raza Rhode-Island de 15-16 días de incubación, los cuales fueron decapitados para proceder inmediatamente a la disección de la bursa (figura 7).

Disección de la Bursa: se practicó una incisión en la región ventral del abdomen del embrión, sacando hacia los lados las vísceras para dejar al descubierto la parte distal del intestino grueso, el cual se cortó un tercio antes de que terminara, levantándose hacia adelante para que la bursa quedara expuesta. Se extrajo la bursa, colocándose en solución salina estéril libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} para eliminar los restos de tejido conjuntivo que la rodea. Posteriormente se seccionó en pequeños fragmentos y se lavó dos veces con solución estéril salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Disociación Enzimático-Mecánica: Los fragmentos de bursa se colocaron en una solución de tripsina (GIBCO, EEUU) al 0.25% a razón de 2 ml por bursa utilizada. Se incubaron en un baño a temperatura constante (Dubnoff, EEUU) durante 25 min a 37 °C con agitación constante de 90 ciclos por minuto. Al final del período de incubación las fracciones de tejido se lavaron dos veces con solución salina estéril libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y se resuspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO, EEUU) enriquecido con 15 % de suero de feto



Figura 7. Diagrama de la elaboración del cultivo primario de células de la *bursa de Fabricius*.

bovino (SBF) (GIBCO, EEUU) y 0.1% de una solución de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml y estreptomycin 10,000 U/ml; GIBCO, EEUU), a razón de 1.5 ml por bursa. A continuación se procedió a realizar la disociación mecánica, pasando los fragmentos a través de una pipeta Pasteur flameada a la cual se le había reducido el diámetro de entrada. Para eliminar los acúmulos de células no disociadas y tejido conjuntivo, la suspensión celular se filtró a través de una malla fina de nylon. Se determinó la viabilidad por la técnica de exclusión celular de azul Tripano (Sigma, Chemical Co., EEUU). La suspensión se ajustó a 1×10^6 células vivas/ml de medio.

Incubación de la Suspensión Celular: Las células dispersas se sembraron en cajas de Petri calidad cultivo de tejido (35mm de diámetro; NUNCLON, Denmark) a razón de 2 ml/caja y se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire. El DMEM se cambió diariamente.

5.2 SUSTRATOS

Se usaron 2 diferentes tipos de sustratos sobre las cajas de Petri calidad cultivo de tejido para observar en cuál de ellos crecían mejor las células y compararlos con respecto al crecimiento celular sobre la caja de Petri sin ningún sustrato:

a) Colágena Tipo I (2 mg/ml, obtenida de tendones de cola de rata por el método del ácido acético; *Methods of Enzimology*, Vol. LVII): se aplicó uniformemente por medio de hisopos de algodón sobre el fondo de la caja de petri y se esterilizó durante 1/2 hora con U.V. Finalmente se hicieron dos lavados de 10 min cada uno con agua bidestilada estéril.

b) Poli-L-lisina (10 mg/ml) (Sigma Chemical Co., EEUU): se agregó 1 ml de una solución esterilizada a la caja de Petri y se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente. Al final se desechó la solución y se lavó la caja dos veces con agua bidestilada estéril.

5.3 TRATAMIENTO DEL CULTIVO CON ANDROGENOS

En esta parte del trabajo se utilizaron cajas de Petri calidad cultivo de tejido. Las hormonas utilizadas fueron:

a) Testosterona (4-androsten-17 β -ol-3-one) (Sigma Chemical Co., EEUU)

b) Dihidrotestosterona (5 α -androstan-17 β -ol-3-one) (Sigma Chemical Co., EEUU)

Se probaron distintas concentraciones de las hormonas, para lo cual se hicieron soluciones concentradas de cada una en etanol absoluto (Merck, EEUU). El cultivo celular se incubó durante 24 horas sin aplicación de las hormonas, para permitir que en este lapso las células se adhirieran al sustrato de la

caja y comenzaran a formar acúmulos. Posteriormente, el cultivo se dividió en dos lotes, uno testigo y el otro experimental. El lote testigo a su vez se subdividió en dos, uno se dejó desarrollar sin añadirle nada (control) y al otro se le agregó 10 ul de etanol absoluto para controlar el efecto del vehículo utilizado en la dilución de las hormonas utilizadas (control-vehículo).

A los lotes experimentales se les agregó 10 ul de las diferentes concentraciones de las hormonas (10, 50, 100 y 200 μM). Todos los lotes se incubaron durante 48 horas en las condiciones antes mencionadas.

Control de los Cultivos: Para observar el desarrollo de las células se utilizó un microscopio invertido Zeiss con óptica de contraste de fase, los cultivos tanto controles como experimentales se fijaron con formol salino al 10% a distintos tiempos: 24, 48 y 72 horas de cultivo. Algunas de las muestras fijadas fueron teñidas con la técnica del ácido peryódico de Shiff (PAS), que permite identificar a células epiteliales. Como un índice de crecimiento celular a otro lote de monocapas tanto control como experimental se les cuantificó el contenido de proteínas por la técnica de Lowry (Lowry et al, 1951).

5.4 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó por medio de ANOVA y con la prueba de Turkey-Kramer. Utilizando el programa InStat (GraphPad Software.V2.03). Los resultados se muestran como $X \pm E.S.$ de 4 experimentos realizados por triplicado.

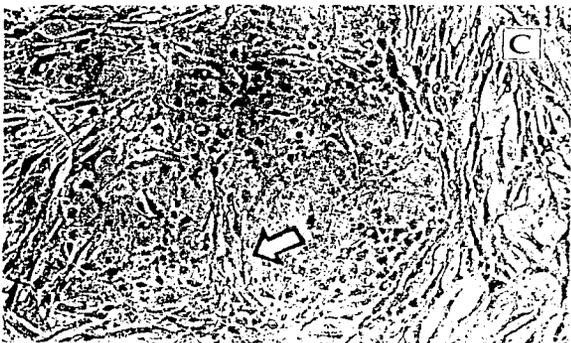
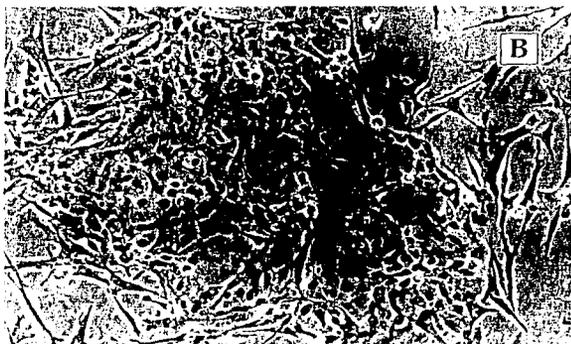
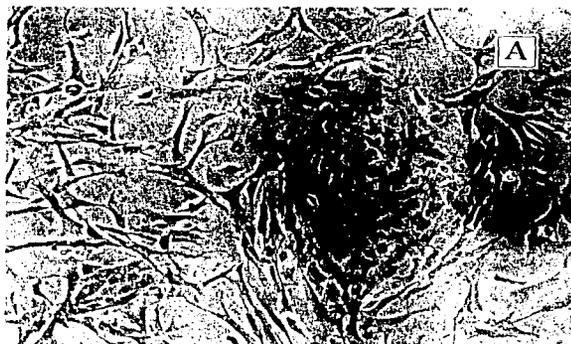
6. RESULTADOS

6.1 MORFOLOGIA DEL CULTIVO

En esta primera fase, se utilizaron cajas de petri calidad cultivo de tejido para el crecimiento de las células.

En la figura 8 se muestran microfotografías de la secuencia del cultivo de células aisladas de bursa de Fabricius a distintos tiempos de incubación. A las 24 h (microfotografía A) se observaron algunos acúmulos de células con apariencia epitelioide; alrededor de éstos se aprecian células alargadas con apariencia fibroblastoide organizadas en forma laxa. En la microfotografía B se muestra un cultivo de 48 h de desarrollo, donde se observa que los acúmulos de células epitelioides han aumentado en tamaño y que las células de tipo fibroblastoide siguen agrupadas alrededor de los acúmulos. A las 72 h de cultivo las células de tipo fibroblastoide han proliferado notoriamente adquiriendo un aspecto denso, por otro lado estas células se proyectan hacia el interior de la masa celular epitelioide, la cual a este tiempo de cultivo presenta un aumento en sus dimensiones (microfotografía C).

Figura 8. A: Microfotografía que muestra la morfología de las células de la bursa de Fabricius a las 24 h de cultivo. **B:** Microfotografía de la morfología del cultivo a las 48 h **C:** Microfotografía del cultivo a las 72 h, la flecha indica el sitio de proyección de células de tipo fibroblastoide en el cúmulo de las células de tipo epitelioide. 200X



La figura 9 muestra una microfotografía de un cultivo de 24 hrs. teñido con PAS. Las células que resultaron PAS positivas presentan forma poliédrica (epitelióide) y se organizan formando acúmulos. Cabe mencionar que las células epitelioides localizadas en la periferia de estos acúmulos presentaron una reacción de mayor intensidad al PAS. Las células de tipo fibroblástico no reaccionaron con el PAS.



Figura 9. Microfotografía de un cultivo de 24 h de células aisladas de bolsa de Fabricius, teñidas con PAS. X625

6.2 TIPO DE SUSTRATO

Para algunos tipos celulares dependientes del anclaje al sustrato la naturaleza de la superficie del cultivo tiene efecto en el crecimiento celular. Las cajas de plástico calidad cultivo son especialmente tratadas durante su manufactura para proporcionar una superficie hidrofílica, la cuál promueve tanto la adhesión como el crecimiento de las células cultivadas. Los polímeros básicos, como la poli-l-lisina, que proporcionan una superficie con cargas positivas mejoran tanto la adhesión como la tasa de proliferación de la mayoría de las células (McAteer y Douglas, 1979). La colágena, que es el principal componente de la matriz extracelular a la cual se adhieren las células, ha sido frecuentemente utilizado para establecer cultivos primarios ya que la mayoría de las células epiteliales se adhieren más eficientemente a él que a otros sustratos de cultivo (Maurer, H.R., 1989).

Después de observar el desarrollo de las células a diferentes tiempos sobre la caja de Petri calidad cultivo de tejido, sin adición de sustratos especiales, se utilizó poli-l-lisina y colágena como sustrato con el fin de comparar ambas condiciones de cultivo.

Sobre el sustrato de poli-l-lisina, a las 24 horas, se observó una menor cantidad de acúmulos celulares de tipo epitelioide. En términos generales, el tamaño de los acúmulos fue menor con respecto a los de las células cultivadas sobre las cajas

calidad cultivo de tejido en el mismo tiempo. Por otro lado, las células fibroblastoides presentaron un patrón de distribución muy semejante al observado en las cajas calidad cultivo (figura 10A y 12A).

A las 48 h de cultivo el patrón de crecimiento de las dos poblaciones celulares estudiadas fue similar en las dos condiciones de cultivo. (figura 10B y 12B).

En el cultivo de 72 h se observó que sobre la poli-l-lisina los acúmulos de células de tipo epiteliode dejaron de crecer y empezaron a desprenderse. El tamaño de los acúmulos fue similar al observado en el cultivo de 48 h, sobre este mismo sustrato. Contrariamente a lo observado en los cultivos con poli-l-lisina de 48 hrs. que no presentaron cambios en el tamaño de los acúmulos celulares, en los cultivos en caja calidad cultivo, de 72 horas si se observó un incremento en el tamaño de los acúmulos.

Con respecto a la población de tipo fibroblastoide, ésta tuvo una menor proliferación sobre el sustrato de poli-l-lisina en comparación con la observada en las cajas calidad cultivo, aunque el patrón de distribución fue similar, es decir, proliferan entre los acúmulos y emiten proyecciones al interior de éstos (fig. 10 C y 12C).

El desarrollo del cultivo sobre el sustrato de colágena a las 24 h. fue muy similar al observado en las cajas calidad cultivo, es decir, se observaron acúmulos de células de tipo epiteliode bien extendidos, algunas de las células de tipo

fibroblastoide rodeaban a los acúmulos y otras se encontraban diseminadas en el resto del cultivo (fig. 11A y fig 12A). A las 48 hrs., los acúmulos de células de tipo epitelioide aumentaron de tamaño y la proliferación de las células fibroblastoides fue mayor. El patrón de crecimiento fue similar al observado sobre las cajas calidad cultivo en el mismo tiempo (fig. 11B y 12B). Las diferencias entre los dos tipos de sustratos se observaron a las 72 hrs. de cultivo, mientras que sobre la caja calidad cultivo los acúmulos empezaron a desprenderse, sobre la colágena los acúmulos se siguieron observando extendidos. Las células de tipo fibroblastoide proliferaron de manera similar en los dos tipos de sustrato utilizados (fig. 11C y 12C).

Figura 10. A: Microfotografía que muestra la morfología de las células de la bolsa de Fabricius cultivadas sobre un sustrato de poli-L-lisina a las 24 h de cultivo. **B y C:** Microfotografías en las mismas condiciones anteriores a las 48 y 72 h de cultivo respectivamente. X600.



Figura 11. A: Microfotografía que muestra la morfología de las células de la bolsa de Fabricius cultivadas sobre un sustrato de colágeno a las 24 h de cultivo. **B y C:** Microfotografías en las mismas condiciones anteriores a las 48 y 72 h de cultivo respectivamente. **A y B X600, C X300.**



Figura 12. A: Microfotografía que muestra la morfología de las células de la bolsa de Fabricius cultivadas sobre la caja de petri calidad cultivo de tejido a las 24 h de cultivo. **B y C:** Microfotografías en las mismas condiciones anteriores a las 48 y 72 h de cultivo respectivamente. **A y B X600, C X300.**



6.3 EFECTO DE LA APLICACION DE ANDROGENOS

A las 24 horas de la aplicación de las hormonas, con ninguna de las cuatro dosis utilizadas (10, 50, 100 y 200 μM) se observaron cambios importantes en la morfología de las dos poblaciones celulares del cultivo con respecto al control (figura 13).

De igual manera a las 48 h del tratamiento con las diferentes dosis de testosterona tampoco se observó algún cambio evidente en la morfología de las poblaciones celulares del cultivo (figura 14 B). Fue hasta las 72 h y solamente con la dosis más alta (200 μM) que se observaron diferencias morfológicas. A este tiempo los acúmulos celulares de tipo epitelioide empezaron a retraerse. Las células fibroblastoides presentaron un aspecto más alargado y su cantidad disminuyó notablemente (figura 15 B).

Con respecto al tratamiento con dihidrotestosterona, se observó que a las 48 h de la aplicación de las diferentes dosis no se presentó un cambio morfológico evidente en las dos poblaciones celulares del cultivo (fig, 14C). Fue hasta las 72 y con una concentración de 100 μM que se observaron cambios muy similares a los encontrados en los cultivos tratados con testosterona a una concentración de 200 μM . Por otro lado, con la concentración de 200 μM de DHT se observó disminución en el tamaño del acúmulo celular acompañado de una mayor dispersión de las células

epitelioides. Estos cambios en el patrón de organización celular también se observaron en la población de células de tipo fibroblástico (fig. 15C)

Figura 13. A: Microfotografía que muestra la morfología de un cultivo de células de bolsa de Fabricius de 24 h sin ningún tratamiento. B: microfotografía de un cultivo de 24 h tratado con 200 μ M de testosterona. C: microfotografía de un cultivo de 24 h tratado con 200 μ M de DHT. X600.

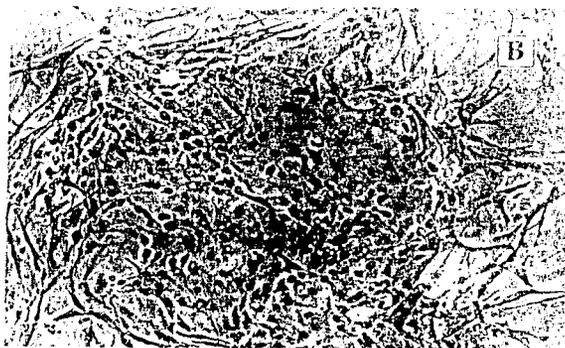
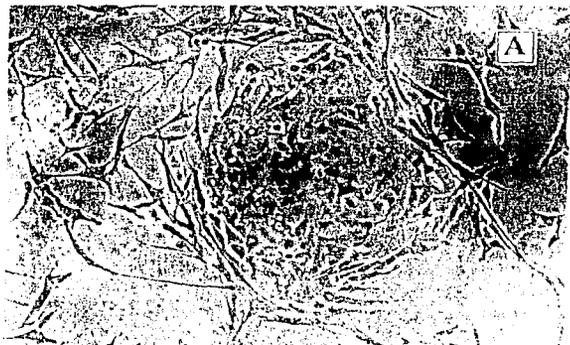


Figura 14. A: Microfotografía que muestra la morfología de un cultivo de células de bolsa de Fabricius de 48 h sin ningún tratamiento. **B:** microfotografía de un cultivo de 48 h tratado con 200 μM de testosterona. **C:** microfotografía de un cultivo de 48 h tratado con 200 μM de DHT. X600.

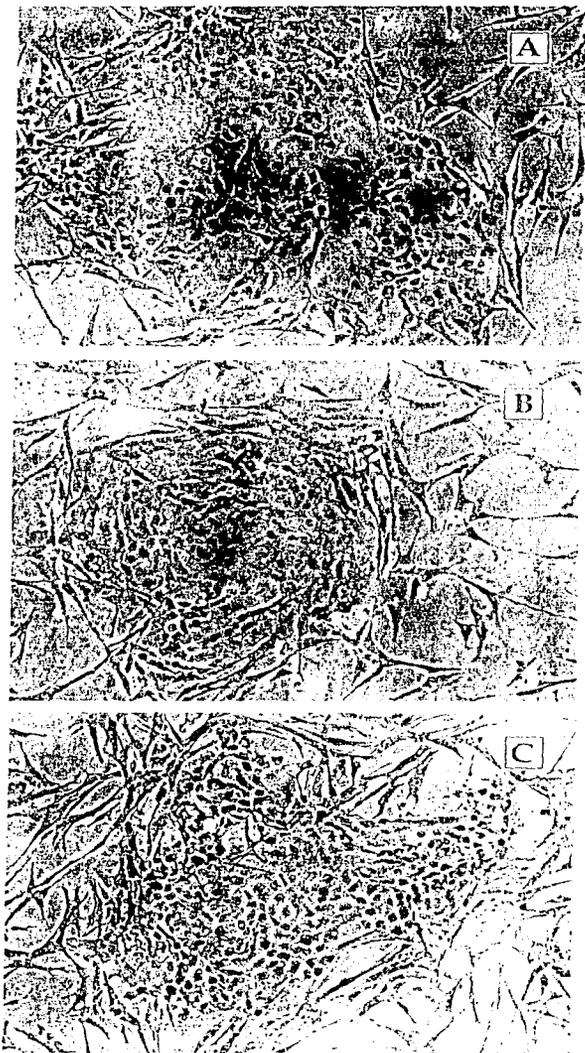
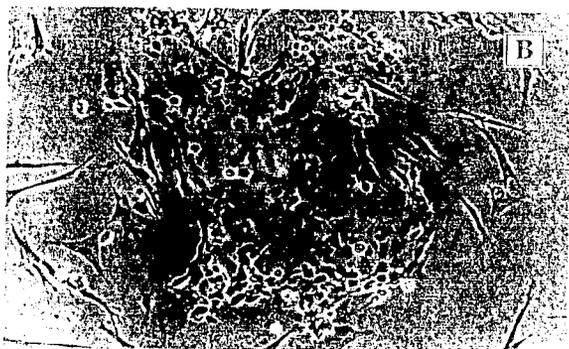
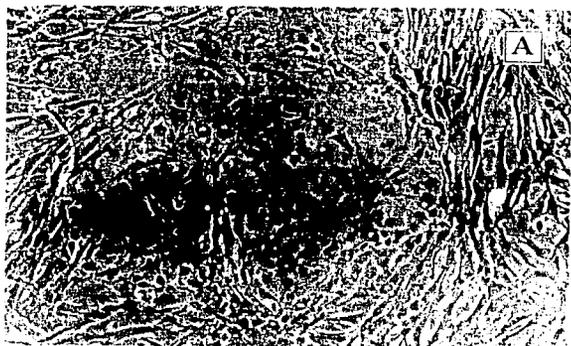


Figura 15. A: Microfotografía que muestra la morfología de un cultivo de células de bolsa de Fabricius de 72 h sin ningún tratamiento. **B:** microfotografía de un cultivo de 72 h tratado con 200 μM de testosterona. **C:** microfotografía de un cultivo de 72 h tratado con 200 μM de DHT. X600.



6.3.1 Cuantificación de proteínas

Al realizar la cuantificación de proteínas de los cultivos de 72 hrs. después de la aplicación de los andrógenos, se observó que las dosis de 10 y 50 μM de testosterona aumentan ligera, aunque significativamente las proteínas del cultivo con respecto al control. La dosis de 100 μM no tuvo ningún efecto y la dosis de 200 μM produjo un decremento del contenido de proteínas totales del cultivo. Con respecto al efecto de la dihidrotestosterona se observó que a partir de la dosis de 50 μM produce una disminución significativa de la cantidad de proteínas totales del cultivo (Figura 16).

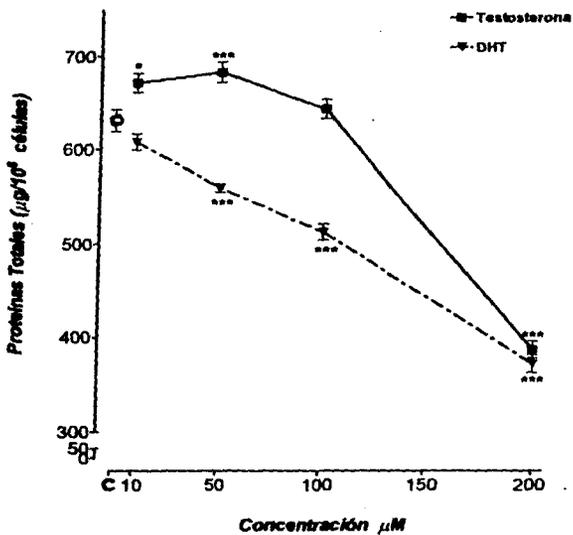


Figura 16. Efecto de la aplicación de andrógenos sobre la concentración total de proteínas del cultivo. C (o) muestra el grupo control que no recibió tratamiento. Los datos son el promedio de 4 experimentos \pm E.S. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

7. DISCUSION

En el presente trabajo se logró, por primera vez, obtener un cultivo de células aisladas de la bolsa de Fabricius de embrión de pollo. En el referido cultivo fue posible observar la presencia de dos diferentes tipos celulares: células de tipo epitelial y células fibroblastoides. Como se mencionó en resultados, las células de tipo epitelial se presentan como acúmulos rodeados de células de apariencia fibroblastoide. El hecho de que los acúmulos fueran positivos a la tinción de PAS sugiere su naturaleza epitelial (Wekerte et al., 1973; Loof F., 1979). Sería necesario realizar tinciones con anticuerpos específicos para poder distinguir los diferentes tipos de células epiteliales. Las células de tipo fibroblástico rodean a estos acúmulos en una relación mesénquima-epitelio típica.

Otros autores (Eerola E., 1980; Boyd et al., 1983) han desarrollado cultivos de órgano de bursa de animal adulto, en específico del epitelio bursal para estudiar el papel de éste en la diferenciación de los linfocitos B. El cultivo de células aisladas que se presenta en este trabajo es un buen modelo para estudiar la interacción entre las poblaciones celulares epiteliales y fibroblásticas que la componen. Por otro lado, permite hacer cocultivos con otro tipo de células como las de Leydig, para observar su crecimiento en presencia de estas células. También es posible el estudio de los efectos directos de hormonas y otros factores de interés en el desarrollo de la bursa.

En este trabajo se evaluaron distintos tipos de sustratos para el cultivo. La utilización de cajas de Petri calidad cultivo de tejido permitió el desarrollo de los acúmulos de tipo epitelial y de la población de tipo fibroblástico, las cuales se desarrollaron en buenas condiciones a pesar de la falta de sustratos adicionales. Se utilizaron asimismo otros sustratos con la intención de observar si el desarrollo del cultivo sufría alguna modificación. Un sustrato de poli-l-lisina permite un buen anclaje de las células a la superficie de la caja cubierta con este sustrato (McKeehan W.L. y Ham R.G., 1976), en nuestro caso no presentó ventaja en comparación con la caja sin sustrato o con colágena, ya que el crecimiento de las dos poblaciones celulares presentes en el cultivo fue menor.

En cambio, en presencia de colágena, que es el principal componente de la matriz extracelular y que ha probado ser mejor sustrato que el vidrio y el plástico para el crecimiento y diferenciación de algunas células, particularmente epiteliales y neuronas (Maurer, H.R., 1989) hubo un excelente desarrollo. En la población epitelial, desde el inicio del cultivo y también a las 72 hrs. se observaron grandes acúmulos de células de tipo epitelial expandidos sobre el sustrato. Dado que, probablemente la colágena también estimuló el desarrollo de la población de fibroblastos, los acúmulos de células de tipo epitelial no se desprendieron aún a las

72 h de cultivo. Estos datos indican que para cultivos prolongados es conveniente la utilización de un sustrato de colágena.

Con base en las observaciones temporales del desarrollo del cultivo y a las características del mismo sobre los sustratos utilizados, se optó, finalmente para los experimentos con andrógeno, por la utilización de cultivos de 24 hrs. Esta decisión se tomó porque en este tiempo los acúmulos de células de tipo epitelial se encuentran bien establecidos y el crecimiento de las células de tipo fibroblástico es mínimo. Dado que en estos experimentos las observaciones del efecto de andrógenos se realizaron hasta las 72 h después de la aplicación de éstos, se evitó así que la proliferación del tipo fibroblástico influyera demasiado en los resultados. Asimismo se optó por la utilización de las cajas de Petri calidad cultivo de tejido, ya que en este tiempo no hubo diferencias evidentes entre las mismas sin sustratos adicionales y aquellas recubiertas de colágena.

Para la histogénesis de la bursa de Fabricius y la diferenciación de los linfocitos B en la misma, es importante la interacción entre sus componentes epiteliales y mesenquimatosos (Le Douarin et al., 1975; Houssaint et al., 1976). Por otro lado, se ha observado que los andrógenos juegan un papel importante en el desarrollo de la bursa. Por tanto en el presente trabajo se estudió el efecto de la testosterona y la DHT en un modelo *in vitro* de cultivo en monocapa con el objeto

investigar si estos andrógenos producían cambios morfológicos en las dos poblaciones celulares identificadas.

En cuanto al efecto de la administración de la testosterona se observó que la dosis de 200 μM fue la que provocó cambios morfológicos evidentes así como una disminución en el número de células. Esto pudo deberse a que a dicha concentración la testosterona provocó muerte celular o favoreció el que las células se desprendieran del sustrato. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos *in ovo* por Norton y Wira (1977) en donde al administrar propionato de testosterona y progesterona en altas dosis se inhibía el crecimiento de la bursa estimado como peso de la misma. De hecho Rao (1962) informó que la administración de testosterona tenía un efecto negativo sobre la tasa mitótica del epitelio bursal. Por otro lado, la administración de las concentraciones de 10 y 50 mM aparentemente no tuvieron efecto sobre la morfología y el número de células.

En coincidencia con los resultados reportados *in ovo* por Aspinall et al. (1961), adonde estudiando el efecto de varios esteroides sobre el desarrollo de la bursa se encontró que la DHT era el esteroide que inhibía más potentemente el crecimiento de la misma, en nuestro modelo la DHT provocó cambios morfológicos y disminución en el número de células. Estos resultados sugieren que la alteración de las poblaciones celulares del cultivo, causadas por la DHT o testosterona en dosis altas,

que posiblemente corresponden a los componentes epiteliales y mesenquimatosos de la bursa, no permitirían *in vivo* una histogénesis normal de la misma y consecuentemente la infiltración de las células madres hematopoyéticas. En este sentido, Le Douarin et al. (1980) encontraron en sus experimentos con quimeras de tejido endodermal y mesenquimal que sólo el tratamiento con testosterona del tejido endodermal no permitía la histogénesis normal de la bursa de Fabricius.

En cuanto al efecto de estos andrógenos en el contenido total de proteínas del cultivo se observó un efecto trófico modesto aunque significativo de la testosterona a las concentraciones más bajas utilizadas (10 y 50 μM) en este estudio. Este efecto inductor de la acumulación de proteínas celulares ha sido reportado clásicamente como un resultado de los efectos transcripcionales de los andrógenos (Tresguerres, 1992). En cambio con la concentración de 200 μM se vió una significativa disminución de las proteínas totales del cultivo, asimismo la mayoría de las concentraciones de DHT provocaron una disminución significativa del contenido total de proteínas del cultivo. Estos datos podrían deberse a varias causas, por ejemplo, inhibición de proliferación celular (Rao, 1962).

En resumen el presente trabajo permitió obtener por primera vez un cultivo en monocapa de células de la bursa de Fabricius del embrión de pollo. Este modelo

resultó ser adecuado para el estudio directo del efecto de andrógenos sobre las diferentes poblaciones celulares de dicho órgano.

8. CONCLUSIONES

-Se desarrolló por primera vez un cultivo de células aisladas de la bursa de Fabricius de embrión de pollo.

-En el cultivo de células aisladas de bursa de Fabricius fue posible identificar por medio de la técnica de PAS dos poblaciones celulares: una de tipo epitelial (PAS +) y otra de tipo fibroblástico (PAS -).

-Los sustratos donde mejor se desarrollaron las células de la bursa fueron la caja de Petri calidad cultivo de tejido sin ningún tratamiento adicional, y el colágeno.

-Para cultivos más prolongados funcionó mejor el colágeno.

-Los dos andrógenos utilizados en este estudio, la testosterona y la DHT, provocaron cambios morfológicos en las dos poblaciones celulares identificadas en el cultivo.

-El efecto de las concentraciones bajas de testosterona fue aumentar el contenido total de proteínas del cultivo, mientras que las concentraciones altas lo disminuyeron.

-El efecto de la aplicación de la dihidrotestosterona en todas las concentraciones ensayadas en el presente estudio fue disminuir el contenido total de proteínas del cultivo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abbas K.A., Lichtman H.A. y Pober S.J. (1995) *Inmunología Celular y Molecular*. 2° Edición. Interamericana-McGraw Hill
- Ackerman G.A. (1962) Electron microscopy of the bursa of Fabricius of the embryonic chick with particular reference to the lympho-epithelial nodules. *J. Cell Biol.* 13: 127-146
- Ackerman G.A. and Knouff R.A. (1963) Testosterone suppression of mesenchymal alkaline activity and lympho-epithelial nodule formation in the bursa of Fabricius in the embryonic chick. *Anat. Rec.* 146: 23-26
- Aguilar M.C., Romano M. and Pedemera E. (1981) Ultrastructure of Leydig cells in the testis of chicken submitted to early embryonic surgical bursectomy. *J. Anat.* 133: 543-553
- Aranyi P. and Naray A. (1980) Physicochemical characterization of the cytosol glucocorticoid receptors in various lymphoid tissues. *Acta biochim. Biophys. Acad. Sci Hung* 15: 185-198
- Aspinall R.L., Meyer R.K. and Rao M.A. (1961) Effect of various steroids on the development of the bursa Fabricii in chick embryos. *Endocrinology* 68: 944-949.
- Cooper M.D., Peterson R.D.A. and Good R.A. (1965) Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 205: 143-146.

- Eerola E. (1980) *In vitro* culture of chicken bursal epithelium. *Cell. Immunol.* 53: 162-172
- Edwards J.L., Murphy R.C. and Cho Y. (1975) On the development of the lymphoid follicles of the bursa of Fabricius. *Anat. Rec.* 181: 735-754
- Gasc J.M., Sar M. and Stumpf W.E. (1979) Androgen Target Cells in the Bursa of Fabricius of the Chick Embryo: Autoradiographic Localization. *Proc. Society for Exptal Biol. and Medicine* 160: 55-58
- Glick, B. (1956) Normal growth of the bursa of Fabricius in chickens. *Poultry Sci.* 35: 843-851
- Glick B., Chang T.S. and Jaap R.G. (1956) The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.* 35: 224-245
- Glick, B. (1957) Experimental modification of the growth of the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* 36: 18-23
- Glick B. and Sadler C.R. (1961) The elimination of the bursa of Fabricius and reduction of antibody production in birds from eggs dipped in hormone solution. *Poultry Sci.* 57: 185
- Glick, B. (1964) The bursa of Fabricius and the development of immunologic competence. En *The Thymus in Immunobiology* (Edit. por Good, R.A. y Gabrielsen A.E.). Harper & Row, New York.. pp. 343-358

- Glick B. (1980) The thymus and bursa de Fabricius: Endocrine organs. En "Avian Endocrinology" (Editado por A. Epple and M. H. Stetson), pp.209-229. Academic Press, New York.
- Graetzer M.A., Wolfe H.R., Aspinall R.L. and Meyer R.K. (1963) Effect of thymectomy and bursectomy on precipitin and natural hemagglutinin production in the chicken. *J. Immunol.* 90: 878-887.
- Grossman C.J., Roselle G.A. and Mendenhall C.L. (1991) Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40: 649-659
- Houssaint E., Belo M. and Le Douarin N.M. (1976) Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Develop. Biol.* 53: 250-264
- King C.S., Lin Y.C., Fukaya T. and Rikihisa Y. (1985) *In vivo* and *in vitro* inhibition of human chorionic gonadotropin-induced testosterone production in rat testis by bursa of Fabricius extract. *Poultry Sci* 64: 1223-1226
- Kirkpatrick, C.M. y Andrews, F.W. (1944) The influence of the sex hormones in the bursa of Fabricius of ring-necked pheasants. *Endocrinology* 34: 341-
- Le Douarin N.M., Houssaint E., Jotreau E. and Belo M. (1975) Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2701-2705

- Le Douarin N.M., Michel G. and Baulieu E.E. (1980) Studies of testosterone-induced involution of bursa of Fabricius. *Development Biology* 75: 288-302
- Loof F. (1979) Mouse thymus reticulo-epithelial (RE) cells in vitro: Isolation, cultivation and preliminary characterization. *Immunology* 37: 157-177
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193: 265-275
- Marshall A.J. (1960) *Biology and Comparative Physiology of Birds. Vol. I.* Academic Press, New York and London.
- Maurer H.R. (1989) Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. En "Animal cell culture, a practical approach" (Editado por Freshney R.I.) pp. 13-31. Irl Press. Oxford-Washington DC.
- McAteer J.A. and Douglas H.J.W. (1979) Monolayer culture techniques. En *Methods in Enzimology, Vol. LVIII* (Editado por Jakoby B.W. y Pastan I.H.) pp.132-140. Academic Press, Inc. U.S.A
- Meyer R.K., Rao M.A. and Aspinnall R.L. (1959) Inhibition of the development of the bursa of Fabricius in the embryos of the common fowl by 19-nortestosterone. *Endocrinology* 64: 890-897
- Moore M.A.S. and Owen J.J.T. (1966) Experimental studies on the development of the bursa of Fabricius. *Develop. Biol.* 14: 40-51

- Mueller A.P., Wolfe H.R., Meyer R.K. and Aspinall R.L. (1962) Further studies on the role of the bursa of Fabricius in antibody production. *J. Immunol.* 88: 354-360. -
- Norton J.M. and Wira C.R. (1977) Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of Fabricius in chick embryos. *J. Steroid Biochem.* 8: 985-987.
- Olah, I. y Glick, B. (1978) The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* 57: 1445-1450
- Ortega L.G., Kattine A.A. and Spurlock B.O. (1965) Lympho-epithelial interactions in the developing bursa of Fabricius. *Fed. Proc.* 24:160
- Paul W.E. (1993) *Fundamental Immunology*. Third Edition. Raven Press.
- Pedemera E., Romano M. and Aguilar M.C. (1980) Influence of early surgical bursectomy on Leydig cells in the chick embryo testis. *J. Steroid Biochem.* 12: 517-519
- Rao M.A., Aspinall R.L. and Meyer R.K. (1962) Effect of dose and time of administration of 19-nortestosterone on the differentiation of lymphoid tissue in the bursa Fabricii of chick embryos. *Endocrinology* 70: 159-166
- Reid L.M. y Rojkind M. (1979) New techniques for culturing differentiated cells: reconstituted basement membrane rafts. En *Methods in Enzimology*, Vol. LVIII (Editado por Jakoby B.W. y Pastan I.H.). Academic Press, Inc. U.S.A. pp. 263-278

- Romano M., Aguilar M.C., Mendez M.C. and Pedemera E. (1981) Bursa of Fabricius produces in vitro a factor which inhibits the chorionic gonadotropin response of the newly hatched chick testis. *J. Steroid Biochem.* 15: 429-432
- Sullivan D.A. and Wira C.R. (1979) Sex hormones and glucocorticoid receptors in the bursa of Fabricius of immature chicks. *J. Immunol.* 122: 2617-2623
- Tresguerre. J.A.F. (1992) *Fisiología Humana. 1ª Edición. Interamericana-McGraw-Hill.* pp. 1073-1086.
- Wekerle H., Cohen I.R. and Feldman M. (1973) Thymic reticulum cell cultures confer T cell properties on spleen cells from thymus-deprived animals. *Eur. J. Immunol.* 3: 745-748
- Wolfe H.R., Sheridan S.A. Bilstad N.M. and Johnson M.A. (1962) The growth of lymphoid organs and the testis of chickens. *Anat. Rec.* 142: 485-493
- Ylikomi T., Gasc J.M., Isola J., Baulieu E.E. and Tuohimaa P. (1985) Progesterone receptor in the chick bursa of Fabricius: Characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117: 155-160