

# TRASPLANTE DE BOLSA DE FABRICIUS EN AVES (*Gallus Domesticus*) BURSECTOMIZADAS Y TIMECTOMIZADAS \*

A. A. SCHUDEL \*\*

Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias  
UNLP — 60 - 118 — La Plata

## R E S U M E N

*Aves de un día de edad fueron bursectomizadas y thymectomizadas por métodos quirúrgicos. Dentro de las 48 hs. posteriores al nacimiento se aplicó radiación X en dosis sub-letal. Los trasplantes de tejidos o células, de Bolsa de Fabricius, se realizaron en diferentes formas y localización, según el diseño experimental.*

*En casos en que el trasplante consistió en trozos de Bolsa de Fabricius o el órgano completo, se observó la característica reacción de rechazo por parte del hospedador.*

*La falta de tejido dependiente de la Bolsa de Fabricius en bazo, luego de la bursectomía quirúrgica e irradiación fue un hallazgo frecuente.*

*En las condiciones experimentales empleadas la reconstitución funcional de las aves no pudo ser lograda.*

## S U M M A R Y

*One day old chickens were bursectomized-thymectomized by surgical procedures. Forty eight hours after hatching they were X-radiated by a sub-lethal dose.*

*The grafted bursa cells or tissue were performed at different times.*

*Types and localizations of grafted tissues were variable according with the experimental design.*

*In some of the grafted birds wasting syndrome was observed. The absence of lymphoid dependent bursa tissue in the spleen was a common finding in bursectomized-X radiated birds.*

*Under our experimental conditions we were not able to reconstitute functionally the bursectomized-X radiated birds by bursa grafts.*

---

\* Trabajo realizado con una beca externa del CNICyT.

\*\* J. P. Prácticos. Cátedra de Virología. UNLP. Miembro de la Carrera de Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CNICyT).

## ANTECEDENTES

En forma accidental Glick, Chang y Japp en 1956 (6) encuentran una reducción substancial en la capacidad formadora de anticuerpos en pollos bursectomizados en forma quirúrgica u hormonal. Posteriormente esos resultados son confirmados por otros, Mueller, Wolfe y Meyer 1960 (10).

El papel del timo y la Bolsa de Fabricius en el desarrollo del sistema inmunológico de las aves ha sido aclarado en cuanto al mecanismo de respuestas (2), y si bien, ambos órganos son necesarios para el logro de una total potencialidad inmunológica hay una disociación funcional muy marcada (13).

La Bolsa de Fabricius controla la producción de anticuerpos humorales (6); y el timo controla las reacciones inmunológicas en las que intervienen elementos celulares, caso de rechazo de órganos e hipersensibilidad retardada (9).

La Bolsa de Fabricius es un órgano linfopitelial que ocupa la parte dorsal de la cloaca comunicándose con ella por un estrecho conducto. Consta de un estroma conjuntivo, y folículos linfáticos con una bien diferenciada zona cortical y medular. (Hay numerosas revisiones que actualizan los conceptos ya enunciados, Cooper, Peterson, South y Good 1956 (2); Warner y Szenberg 1964 (13)).

La extracción de la Bolsa de Fabricius por métodos quirúrgicos, o por métodos hormonales, lleva a una disminución o falta total de respuesta a algunos antígenos; sin embargo el mecanismo por el cual esta función opera no está completamente aclarado. Varios intentos de probar la existencia de síntesis de  $\gamma$  globulina en Células de Bolsa de Fabricius, o en los folículos linfáticos dependientes de Bolsa de Fabricius en bazo, han resultado infructuosos, Dent y Good 1965 (4) y Takahashi

1967 (12). El último de los nombrados probó en forma conclusiva la necesidad del aporte inicial de células linfocíticas de Bolsa de Fabricius y la producción de un factor humoral que promueve la proliferación de células linfocíticas y su madurez inmunológica.

En 1960 Glick (7) publicó resultados poco claros en cuanto a la reconstitución funcional de aves bursectomizadas por inoculación de extractos de Bolsa de Fabricius.

St. Pierre y Ackerman en 1965 (11) reconstituyen aves bursectomizadas en forma hormonal (propiolato de testosterona) con porciones de tejido de Bolsa de Fabricius en Cámaras millipore, empleando como prueba funcional la inoculación con *Salmonella Pollorum*.

Cooper, Schwartz y Good 1966 (3) logran aves agamaglobulinémicas luego de bursectomizadas e irradiadas con 740 r. en las primeras 48 horas de vida. Si las aves así tratadas son inoculadas por vía intraperitoneal con una suspensión celular de Bolsa de Fabricius (autólogo), logran producción de inmunoglobulinas y presencia de folículos linfáticos en bazo con presencia de células plasmáticas; sin embargo las aves fallan en la reconstitución funcional de Bolsa de Fabricius frente a dos antígenos, *Brucella Abortus* y Albúmina Sérica Bovina.

Arnason y Jankovic 1967 (1) no pudieron obtener aves agamaglobulinémicas luego de efectuar bursectomía en el día del nacimiento. Elaine, Rose y Orleans en 1968 (5) obtienen resultados similares empleando bursectomía hormonal e irradiación.

El presente trabajo trata por lo tanto, de clarificar estos confusos resultados bajo nuestras condiciones experimentales.

## MATERIALES Y METODOS

**Aves:** Se emplearon aves (*Gallus Domesticus*) de un día de edad de la línea L 151, provenientes del Programa Libres de Patógenos Específicos. Esta línea no es histocompatible pese a que se la ha mantenido en forma consanguínea por varias generaciones. Durante el período experimental se mantuvieron en condiciones de aislamiento, aunque en algunos aisladores se registraron casos de Enfermedad de Marek. Recibieron además Terramicina en el alimento y Penicilina durante los primeros 30 días de vida en el agua de bebida. Al nacer cada pollo fue individualizado mediante banda numerada en ala.

**Anestésico:** Se empleó 0,03 cc. de Combital (750 mg. thiopental Na y 250 mg. Pentobarbital Na, 1-1,5 mg./ave) en forma intramuscular en pollos de un día de edad.

**Bursectomía:** En las primeras horas luego del nacimiento, se desinfecta la región inmediatamente superior a la cloaca y debajo de la cola, se extraen las plumas de la zona, se hace una incisión ligeramente curva sobre la cloaca (—) con una tijera de punta curva luego con tijera de punta roma se divide y se libera la Bolsa de Fabricius de sus fascias de soporte, se evita cortar los uréteres y con pinza anatómica se toma por la base extrayendo la Bolsa en forma completa. La incisión se sutura con catgut (0000) o con ganchos metálicos.

**Timectomía:** Inmediatamente después de realizada la Bursectomía se desinfecta la región del cuello, extrayendo además las plumas de la zona dorsal del cuello. Se realiza luego una larga incisión desde el extremo occipital de las vértebras cervicales hasta la mitad de las vértebras dorsales. Se divide a ambos lados de la piel, los lóbulos del timo se observan a ambos lados de la arteria carótida, y se extraen con pinza anatómica evitando causar daño en la arteria carótida o nervios

del lugar. Se sutura con catgut (0000) o ganchos metálicos.

**Operación simulada:** Desinfección e incisión de la piel en región de Bursectomía y Timectomía en la forma descripta, y sutura.

**Irradiación:** Todas las aves fueron irradiadas con radiación X en forma total en las primeras 48 hs de vida, en forma simultánea, con el mismo Kv y penetración. La distancia a la fuente de irradiación fue constante en los distintos experimentos y la variación individual en cada aplicación menor del 2 %. Las condiciones de irradiación fueron 225 PKV, 20 ma con 0,25 Cu más 1 mm de Al agregado, con un hvl de 0,25 Cu a una dosis de 6,4 R/minuto, en un aparato General Electric Maxitron 300 X-ray. La aplicación se realizó en forma simultánea a lotes de 100 pollos por vez. La dosis de radiación fue de 800 r con la que se obtuvo una mortalidad del 50 % para la línea L 151.

**Trasplante:** Se utilizaron varios procedimientos:

- a) Trasplante de Bolsa de Fabricius completa, extraída de un ave de la misma edad y fijado con catgut (0000) sobre la cloaca en el lugar que normalmente ocupa.
- b) Bolsa de Fabricius extraída con asepsia y cortada en pequeños trozos, luego puestos en pliegues musculares pectorales, tejido subcutáneo e intraperitoneal.
- c) Tripsinado de Bolsa de Fabricius, centrifugado y resuspendido en medio 199 (DIFCO) 1 por  $10^6$  células viables por vía endovenosa por ave.
- d) El mismo tratamiento anterior; pero las células viables fueron introducidas en una cámara Millipore con membrana de 0,2  $\mu$  de diámetro de poro, colocadas en cavidad peritoneal

**Sangría:** La extracción se efectuó por punción cardíaca, colectando las muestras obtenidas en tubos y procesando el suero en las 10 hs. posteriores a su extracción. Todos los sueros se mantuvieron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$

**Inmunoelectroforesis:** (Microtécnica de Scheidiger). Realizada en agar 1.5 % con Bufer Veronal-Barbital pH 8,6, enfrentando sueros problema a sueros de conejo anti-pollo, preparados con sueros de la línea L 15I. Antes de poner los reactivos para la difusión se sumergió el gel en CINA 8 % durante 30'.

**Test Funcional de la Bolsa de Fabricius:** Se realizaron dos inocula-

ciones de Albúmina Sérica Bovina (Fracción V), 40 mg/kg de peso por vía intramuscular y con intervalos de 14 días. La sangría se efectuó a los 7 días de la última inoculación. Para la detección de anticuerpos se utilizó la técnica de Aglutinación pasiva descrita por Gordon, Rose y Sehon (8).

**Necropsias:** Todas las aves muertas durante el período experimental fueron necropsiadas y, bazo, hígado. Bolsa de Fabricius, trasplante o zona de Bolsa de Fabricius en aves bursectomizadas fueron procesados histopatológicamente.

## RESULTADOS

Se realizó un experimento a fin de probar la sensibilidad del test funcional de Bolsa de Fabricius en aves bursectomizadas e irradiadas con 800 r en las primeras 36 hs. de vida. Para ello se inoculó Albúmina Sérica Bovina a las 4 y 6 semanas de edad, sangrando en la séptima semana. La prueba de hemoaglutinación pasiva arrojó los resultados que se detallan en *TABLA N° 1*. En este grupo de aves se realizó un análisis inmunoelectroforético, en busca de individuos agamaglobulinémicos, con resultados negativos, aunque en el grupo Bursectomizado e irradiado se observaron algunas anormalidades en el patrón de precipitación en el área de las globulinas gama, sin embargo, ninguna de las aves resultó agamaglobulinémicas

Con un diseño experimental diferente se realizó un nuevo experimento a fin de probar la capacidad de restauración funcional de los trasplantes de Bolsa de Fabricius, para ello todas las aves excepción de los controles, fueron Bursectomizadas y Timectomizadas dentro de las primeras 36 hs. de vida. Inmediatamente de finalizada la timectomía, *TABLA N° 2*, se procedió a trasplantar a los lotes 2-3 con trozos

de Bolsa de Fabricius de aves de un día de edad colocando los trozos de Bolsa en fascias musculares y subcutánea. El lote 4, a los 14 días fue inoculado por vía intravenosa con una suspensión de  $1 \times 10^6$  /ave células viables, obtenidas por triplicación de Bolsa de Fabricius de aves de 14 días de edad. Estas aves se examinaron a los 90 días a fin de detectar la presencia de aves agamaglobulinémicas, con resultados negativos. Al término del período experimental, 210 días, todas las aves sobrevivientes fueron necropsiadas, observándose detalladamente la efectividad de la bursectomía, descartando todas las aves bursectomizadas o bursectomizadas y trasplantadas que presentaban restos de Bolsa de Fabricius en el lugar normal. Se observó además una mortalidad del 50 % en las aves del lote 4 hasta las 8 semanas de vida. Las aves sobrevivientes se retardaron enormemente con respecto a los controles mostrando el típico aspecto de "desgaste" (wasting-runting) característico del síndrome de rechazo de órgano. El estudio anatomopatológico del lugar del trasplante reveló la existencia de una cicatriz de tipo inflamatorio con tejidos de granulación y restos necróticos. En bazo, en los

lotes 2-3-4 se observó una marcada amiloidosis a nivel de los centros germinales dependientes de la Bolsa de Fabricius.

En un tercer experimento se trató de reconstruir aves bursectomizadas y timectomizadas e irradiadas con 800 r en las primeras 36 hs. de vida, por implantación de Bolsa de Fabricius completa (homologa) a los 4 días de edad. En *TABLA N° 3*, se detallan los resultados. Es posible observar que en el lote bursectomizado solamente no se logró una disminución muy marcada en la capacidad funcional de elaborar anticuerpos, sin embargo cuando en el tratamiento interviene bursectomía e irradiación, el efecto es muy significativo.

Por último, en un cuarto experimento, se bursectomizaron e irra-

diaron aves de 1 día de edad seleccionando a los 60 días los negativos al test funcional de Bolsa de Fabricius, e implantándoles cámaras Millipore con membranas de 0,22 mu de diámetro de poro en cavidad peritoneal, conteniendo  $1 \times 10^6$  células viables, provenientes de un tripsinado de Bolsa de Fabricius de aves de la misma edad y línea. *TABLA N° 4*, resume los resultados obtenidos con el test de hemoaglutinación pasiva, realizado a los 60 días y luego del implante, como respuesta a una nueva inoculación. Al lote control no se le implantó cámara Millipore. Todas las cámaras se inspeccionaron a la necropsia y sólo en una de ellas se constató la presencia de células viables al momento de la necropsia. En el resto se observó una marcada reacción conjuntiva y exudado serofibrinoso.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Aún con los resultados obtenidos no es fácil aclarar las controversias existentes en el mecanismo de los fenómenos inmunológicos gobernados por la Bolsa de Fabricius. Nuestros resultados demuestran que no se logra una absoluta agamaglobulinemia en aves bursectomizadas e irradiadas a dosis subletales, datos que concuerdan con los obtenidos por Arnason y Jankovic (1), Elaine Rose y Orleans (5); pero no con los logrados por Cooper y col. (3). Puede que esta variación se deba a la línea de aves empleada o a las condiciones del test de hemoaglutinación pasiva, ya que se utilizaron diferentes antígenos.

En *TABLA N° 1*, se observa en forma clara la falta de influencia de radiación X en dosis subletales en cuanto a modificar por sí sola la capacidad funcional de Bolsa de Fabricius, sin embargo junto a bursectomía quirúrgica la disminución de la actividad funcional es muy significativa. Tal como se observa en la *TABLA N° 2*, cuando a la bursectomía quirúrgica se le adiciona timectomía, la disparidad funcional

no se manifiesta, ello nos permite demostrar que la extracción del timo no juega un papel relevante en la síntesis de anticuerpos, si en cambio la extracción de Bolsa de Fabricius e irradiación total.

La correlación entre el test funcional de Bolsa de Fabricius y presencia de elementos celulares dependientes de la Bolsa de Fabricius en bazo, *TABLA N° 2*, está en completo acuerdo con los resultados obtenidos por Cooper y col. (3).

Los resultados detallados en *TABLA N° 4*, son sin duda los más interesantes, pues se trabajó con aves negativas al test funcional de Bolsa de Fabricius determinadas previo al trasplante, aplicándoles el material a trasplantar en cámaras Millipore, que impiden la reacción de rechazo, ya que las células implantadas en la cámara no se ponen en contacto físico con el hospedador al mediar entre ambas una barrera de 0,22 mu de diámetro de poro. Sólo dos aves resultaron reconstituidas luego del implante y en una de ellas el examen histológico demostró la presencia de células via-

bles en la cámara Millipore. Aun cuando no se puede excluir la presencia de roturas microscópicas en las cámaras el examen final demuestra que no existían alteraciones macroscópicas de las mismas. Estos resultados sugerirían la presencia de una acción estimulante de la actividad funcional de Bolsa de Fabricius lograda al reimplantar células de Bolsa viables, y posiblemente la existencia de un factor soluble producido por estas células. Aunque críticamente el número de aves reconstituidas es muy bajo, creemos conveniente la repetición de este último diseño experimental contemplando la posibilidad de reconstituir las

aves con su propia Bolsa de Fabricius o bien lograr líneas de aves compatibles a trasplantes a fin de eliminar la reacción por rechazo, causa probable de las fallas en experiencias anteriores.

TABLA Nº 1

LOTE	TRATAMIENTO	RESULTADO *
1	Bursectomizados e irradiados	1/12
2	Irradiados	12/12
3	Control	15/15

\* Representa el número de aves positivas a la prueba funcional de Bolsa de Fabricius, sobre el número de aves testadas.

TABLA Nº 2

LOTE	TRATAMIENTO	RESULTADOS	
		A *	B **
1	Bursectomizados y timectomizados	7/17	11/15
2	Bursectomizados, Timectomizados y trasplantados por vía subcutánea	5/14	6/14
3	Bursectomizados, timectomizados y trasplantados por vía intramuscular	7/24	3/21
4	Bursectomizados, timectomizados e inoculados por vía intravenosa	6/10	1/6
5	Control	9/9	6/6

\* Respuesta a la prueba funcional de Bolsa de Fabricius, el numerador representa el total de positivos y el denominador el total analizado.

\*\* Similar al anterior pero representa la presencia de células dependientes de Bolsa de Fabricius en bazo.

TABLA N° 3

LOTE	TRATAMIENTO	RESULTADO *
1	Bursectomizado, timentomizado e irradiado y trasplantado	5/45
2	Bursectomizado, timentomizado e irradiado	2/12
3	Bursectomizado	14/33
4	Control	32/34

\* Resultados de la prueba de Hemoaglutinación pasiva, representa el número de positivos sobre el total.

TABLA N° 4

LOTE	TRATAMIENTO	RESULTADOS *	
		Antes	Después
1	Bursectomizados, irradiados e implantados	0/10	2/10
2	Control	35/38	21/21

\* Resultado de la prueba funcional de Bolsa de Fabricius, representa el número de aves positivas sobre el total examinado antes y después del implante de cámara Millipore con células de Bolsa de Fabricius.

## BIBLIOGRAFIA

1. ARNASON, B.; JANKOVIC, B. D.: "Immunoglobulins after surgical bursectomy in chickens". The Journal of Immunology. Vol. 99, N° 5, (917-924), 1967.
2. COOPER, D.; PETERSON, M.; SOUTH, M.; GOOD, R.: "The function of the thymus and the bursa system in the chicken". Jour. of Exp. Med. Vol. 123, (75-109), 1965.
3. COOPER, M.; SCHWARTZ, M.; GOOD, R.: "Restoration of Gamaglobulin production in agamaglobulinemic chicken". Science, Vol. 151, (471-473), 1966.
4. DENT, P.; GOOD, R.: "Absence of antibody production in the bursa of Fabricius". Nature, July 31, (491-493), 1965.
5. ELAIN, ROSE, M.; ORLEANS M.: "Normal Immune response of bursaless chickens to a secondary antigenic stimulus". Nature, January 20, (231-234), 1968.
6. GLICK, B.; CHANG, T.; JAAP R.: "The Bursa of Fabricius and antibody production in the domestic fowl". Poultry Science 35, (224-226), 1956.
7. GLICK, B.: "Extracts from the Bursa of Fabricius, a lympho-epithelial gland of the chicken, stimulate the production of antibodies in bursectomized chick-

- ens". Poultry Science N° 5, (1097-1101), 1960.
8. GORDON, J.; ROSE, B.; SCHEON, A.: "Detection of non precipitating antibodies in sera of individuals allergic to rayweed pollen by an in-vitro method". J. Exp. Med. 108, (37-51), 1958.
  9. JANKOVIC, B.; ISAKOVIC, K.: "Role of the thymus and the bursa of Fabricius in immunereactions in chickens L-Changes in lymphoid tissue of chickens surgically thymectomized at hatching". Inter. Arch. Allergy & Appl. Immunol. 24, (278-281), 1964.
  10. MUELLER, A.; WOLFE, H.; MEYER, R.: "Precipitin production in chickens X-I-Antibody detection in bursectomized chickens an chickens injected with 19-nortestosterone on the fifth day of incubation". J. Immunology 85, (172-179), 1960.
  11. ST. PIERRE, R.; ACKERMAN, G.: "Bursa de Fabricius in chickens" —Possible humoral factor". Science, (1307-1308), 1965.
  12. TAKAHASKI, K.: "Immunoblogic role of the Bursa de Fabricius and thymus in the development of competence to produce serum antibody in chickens". Japan Jour. of Micro. Vol. II, (1-12), 1967.
  13. WARNER, N.; SZENBERG, A.: "The immunological function of the Bursa of Fabricius, in the chicken". Ann. Rev. of Micro. (118-253), 1964.