



01672  
5.  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**INMUNOPROFILAXIS Y CARACTERIZACION PARCIAL  
DE LINFOCINAS EN LA PROTECCION DE LA  
COCCIDIOSIS AVIAR.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS  
PRESENTADA POR  
M.V.Z. GARY GARCIA ESPINOSA**

**FALLA DE ORIGEN**

**ASESORES PRINCIPALES:**

**Ph.D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS  
Ph.D. VIANNEY F. ORTIZ NAVARRETE**

**COASESORES:**

**M.C. REYNALDO MORENO DIAZ  
Ph.D. ARMANDO ISIBASI ARAUJO  
Ph.D. MICHAEL H. KOGUT**



**MEXICO, D. F.**

**1995**



## **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 está 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.

**INMUNOPROFILAXIS Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LINFOCINAS EN LA  
PROTECCION DE LA COCCIDIOSIS AVIAR**

**Tesis presentada**

**ante la**

**División de Estudios de Posgrado e Investigación**

**de la**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**de la**

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**para la obtención del grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**por el**

**M.V.Z. Gary García Espinosa**

**ASESORES PRINCIPALES: Ph.D. Guillermo Tellez Isaías  
Ph.D. Vianney F. Ortiz Navarrete**

**COASESORES: M.C. Reynaldo Moreno Diaz  
Ph.D. Armando Isibasi Araujo  
Ph.D. Michael H. Kogut**

**México D.F. 1995**

## DECLARACION

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario, siempre y cuando se le otorgue el crédito al autor y a la Institución.



---

Gary García Espinosa

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. *Armando Isibasi Araujo* de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por las facilidades para la realización de los estudios *in vitro*

Al Dr. *Guillermo Tellez Isaias* del Departamento de Producción Animal: Aves de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades para la realización de los estudios *in vitro* e *in vivo*

Al Dr. *Ernesto Avila González* del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades para la realización de los estudios *in vivo*

Al Dr. *Michael H. Kogut* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), por el apoyo a las investigaciones de los estudios *in vivo* e *in vitro*

A la Unidad de Posgrado e Investigación de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo económico a través del premio-beca que otorgo a ésta tesis en 1994.

### A los Asesores:

Ph.D. *Guillermo Tellez Isaias*  
Ph.D. *Vianney Foo. Ortiz Navarrete*  
M.C. *Reynaldo Moreno Díaz*  
Ph.D. *Armando Isibasi Araujo*  
Ph.D. *Michael H. Kogut*

### Al Jurado:

M.C. *Mª Teresa Casaubon H.*  
Ph.D. *Juan Antonio Montaño H.*  
M.C. *Miguel Angel Ceniceros R.*  
M.C. *Reynaldo Moreno D.*  
M.C. *Ernesto Avila G.*

por sus aportaciones valiosas para la realización de esta tesis

### Al:

MVZ *Arturo Cortéz Cuevas*, por su apoyo para la realización de los estudios *in vivo*

### A las:

MVZ *Gabriela Gómez Verduzco* y QFB *Natalia Martín Orozco*, por sus sugerencias y comentarios para la realización de los estudios *in vitro*

## RESUMEN

García Espinosa Gary: Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas, en la protección de la coccidiosis aviar (bajo la dirección del Ph.D. Guillermo Tellez Isaias, Ph.D. Vianney F. Ortiz Navarrete, M.C. Reynaldo Moreno Díaz, Ph.D. Armando Isibasi Araujo y Ph.D. Michael H. Kogut).

En el presente estudio, se evaluó la duración del efecto profiláctico de las linfocinas presentes en el sobrenadante obtenido de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, ante desafíos por *Eimeria tenella* en pollos de engorda, evaluando el tratamiento profiláctico del ET-ILK a través de la severidad de lesión cecal (Estudio 1) y el total de ooquistes en heces (Estudio 2). En el estudio 1, 270 pollos fueron asignados aleatoriamente a tres diferentes experimentos y 3 tratamientos, con tres réplicas cada uno a) Grupo experimental, todas las aves fueron inoculadas intraperitonealmente, a los 14 días de edad con 1 ml del ET-ILK, posteriormente cada grupo fue desafiado con una dosis única de 1000 ooquistes/ave, a los 3 (Experimento 1), 5 (Experimento 2) y 7 (Experimento 3) días posteriores a la administración del ET-ILK; b) Testigo positivo; c) Testigo negativo. Las aves de los experimentos 1 y 2, que recibieron el tratamiento profiláctico del ET-ILK a los 3 y 5 días antes del desafío, resultaron con un 100 y 76% de protección a las lesiones cecales respectivamente, a diferencia de las aves del testigo positivo ( $P < 0.001$ ). Sin embargo no hubo diferencias significativas entre el grupo experimental y positivo desafiados a los 7 días posteriores al tratamiento con las ET-ILK ( $P > 0.05$ ). El estudio 2, fue similar en su diseño al experimento 1, pero en este estudio las aves fueron desafiadas con 200 ooquistes/ave, para evaluar el número total de ooquistes en heces. Los resultados fueron similares al experimento 1, debido a que las aves que recibieron el tratamiento profiláctico con las ET-ILK, mostraron una reducción significativa en el total de ooquistes cecales en comparación con el testigo positivo ( $P < 0.05$ ), pero no así a los 7 días ( $P > 0.05$ ). Estos resultados muestran que la administración profiláctica del ET-ILK inducen protección contra desafíos de *Eimeria tenella* por un máximo de 5 días, al mostrar la reducción en los valores de severidad de lesión cecal y conteo de ooquistes.

Se determinó en este estudio la presencia de dos linfocinas del ET-ILK que han mostrado conferir protección a pollitos de 14 días. Una de ellas es la IL-2 que fue determinada a través de ensayos de proliferación celular, incorporando  $^3\text{H}$ -timidina al ADN celular, mostrando un incremento en la proliferación de linfoblastos de pollo, que fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) con respecto a la pobre proliferación de los linfoblastos de pollo con IL-2 de ratón (C-63). Dentro del estudio también se observó que las diluciones dobles seriadas del ET-ILK disminuyen significativamente la proliferación celular ( $P < 0.001$ ). La presencia de IFN  $\gamma$  y posiblemente de FNT, se determinó por medio de el incremento de moléculas de clase I, clase II y  $\beta_2\text{m}$  del CMH de linfocitos T de pollo, a través de citometría de flujo, observándose un incremento significativo de estos, en comparación con el CMH basal de los linfocitos T de pollo, al adicionar 10 % y 20 % del

sobrenadante llamado ET-ILK ( $P < 0.05$ ), también hubo un incremento significativo de las moléculas clase I y  $\beta_2m$  del CMH de linfocitos T, al aumentar de 10 % del sobrenadante a un 20% ( $P < 0.05$ ), sin embargo no sucedió lo mismo con la expresión de la molécula de clase II ( $P > 0.05$ ). En este estudio, se dan evidencias de que en la inmunidad mediada por linfocitos T contra coccidias aviarias, se encuentran involucradas éstas linfocinas.

## SUMMARY

Broiler chickens were treated prophylactically with the soluble products from Con A-stimulated T-lymphocytes from *Eimeria tenella*-infected chickens (ET-ILK) in order to investigate the effect of such prophylactic treatment on cecal gross lesion score values and total count of oocyst in feces in two separate studies. In studie one, 270 broilers were randomly assigned into 3 different experiments and 3 treatments with 3 replicates each: a) Experimental group, all birds were injected intraperitoneally at 14 days of age with 1 ml/bird of ET-ILK. A subset of birds were then challenged orally with 1000 oocyst/bird at either 3 (experimental 1), 5(experimental 2) or 7(experimental 3) days after ET-ILK administration; b) Positive control; c) Negative control. At both 3 and 5 days post-challenge, prophylactic treatment of chickens with ET-ILK resulted in a 100-76 % protection in cecal score lesion respectively as compared with positive control chickens ( $P < 0.001$ ), although there were no significant differences between experimental and positive control groups at 7 days post-challenge ( $P > 0.05$ ). In studie 2, a similar experimental design was use, however in this experiment, chicks were challenged with 200 oocyst/bird, in order to evaluate the total count of oocyst in feces. Similarly, at both 3 and 5 days post-challenge, prophylactic treatment with ET-ILK also resulted in a significant reduction of the total count of oocyst in feces as compared with positive control group ( $P < 0.05$ ), but not at 7 days ( $P > 0.05$ ). These results indicate that the prophylactic administration of ET-ILK induces protection against *Eimeria tenella* for a maximum of 5 days following the ET-ILK administration, as evidenced by a reduction in both oocyst production and gross lesion score values.

In the present study, the presence of IL-2, IFN  $\gamma$  and probably TNF were determined in the soluble products from Con A-stimulated T-lymphocytes from *Eimeria tenella*-infected chickens (ET-ILK). Using a lymphocyte proliferation assay, the presence of IL-2 was evaluated by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation, showing significant differences ( $P < 0.001$ ) when compared with the negative control C-63/IL-2 recombinant mouse cell line. Alternatively, the presence of Interferon ganuna and probably TNF in the ET-ILK supernates was detected by the increasing cell surface class I and class II molecules expression of the MHC by flow cytometry. In the present study, we provide further evidence that T-lymphocytes mediate immunity against avian coccidia probably through the production of these important lymphokines.

---

Key Words: Broilers, Chickens, *Eimeria tenella*, Interleukin-2, IFN  $\gamma$ , Tumor Necrosis Factor, Lymphokines, T-lymphocytes.



## INDICE

|                                   |      |
|-----------------------------------|------|
| DECLARACION.....                  | II   |
| AGRADECIMIENTOS.....              | III  |
| RESUMEN.....                      | IV   |
| SUMMARY.....                      | VI   |
| INDICE.....                       | VII  |
| LISTA DE CUADROS.....             | VIII |
| LISTA DE FIGURAS.....             | IX   |
| ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS..... | X    |
| INTRODUCCION.....                 | 1    |
| HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....        | 5    |
| MATERIAL Y METODOS.....           | 6    |
| RESULTADOS.....                   | 10   |
| DISCUSION.....                    | 12   |
| CONCLUSIONES.....                 | 15   |
| LITERATURA CITADA.....            | 16   |
| CUADROS.....                      | 21   |
| FIGURAS.....                      | 23   |

## LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Título   | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Evaluación en la disminución de la severidad de lesión cecal al 4º día del periodo de prepatencia de <i>Eimeria tenella</i> , en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con Con-A (ET-ILK), 3 días, 5 días y 7 días antes del desafío respectivamente..... | 21     |
| 2      | Evaluación en la disminución de la severidad de lesión cecal al 6º día del periodo de prepatencia de <i>Eimeria tenella</i> , en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con Con-A (ET-ILK), 3 días, 5 días y 7 días antes del desafío respectivamente..... | 22     |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura | Título  | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Evaluación de linfocinas en el ET-ILK, a través del incremento en la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T.....   | 23     |
| 2      | Evaluación de linfocinas en el ET-ILK, a través del incremento en la expresión de moléculas $\beta_2 m$ del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T.....  | 24     |
| 3      | Evaluación de linfocinas en el ET-ILK, a través del incremento en la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T.....  | 25     |
| 4      | Evaluación de interleucina-2 en el ET-ILK, a través de proliferación de linfoblastos de pollo, con respecto a la interleucina-2 de ratón (C-63).....  | 26     |
| 5      | Efecto de las diluciones sobre el sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra <i>Eimeria tenella</i> , estimulados con concanavalina A (ET-ILK) sobre la proliferación de linfoblastos de pollo..... | 27     |
| 6      | Efecto de las diluciones sobre el sobrenadante de interleucina-2 de ratón (C-63) sobre la proliferación de linfoblastos de pollo.....   | 28     |

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| ZG11              | = AcM anti-moléculas del CMH-II.   |
| $\beta_2m$        | = Molécula $\beta_2$ microglobulina  |
| AcM               | = Anticuerpos Monoclonales   |
| ADN               | = Acido Desoxirribonucleico  |
| Ag                | = Antígeno   |
| ANDEVA            | = Análisis de Varianza   |
| C-G3              | = Interleucina-2 de ratón, proveniente de la línea celular CTL2  |
| CD                | = Marcador de poblaciones celulares  |
| CMH               | = Complejo Mayor de Histocompatibilidad  |
| Con-A             | = Concanavalin A   |
| CFA               | = Célula Presentadora de Antígeno  |
| ET-ILK            | = Sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T, de aves inmunizadas contra <i>Eimeria tenella</i> , estimulados con concanavalina A.    |
| ET-NILK           | = Sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T, de aves no inmunizadas contra <i>Eimeria tenella</i> , estimulados con concanavalina A. |
| F21-2             | = AcM anti-molécula alfa del CMH clase-I.  |
| F21-21            | = AcM anti- $\beta_2$ microglobulina del CMH clase-I.  |
| FEC-GM            | = Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos  |
| FNT               | = Factor Necrosante de Tumores   |
| FNT <sub>4</sub>  | = Factor Necrosante de Tumores 4 ó Linfotoxina   |
| g                 | = gramos   |
| h                 | = Horas  |
| IL-2              | = Interleucina-2   |
| IL-3              | = Interleucina-3   |
| IL-4              | = Interleucina-4   |
| IL-5              | = Interleucina-5   |
| IL-8              | = Interleucina-8   |
| IL-10             | = Interleucina-10  |
| IFN               | = Interferón   |
| IFN $\gamma$      | = Interferón-gamma   |
| IP                | = Intraperitoneal  |
| LB                | = Linfocitos B   |
| LT                | = Linfocitos T   |
| LT <sub>0</sub> V | = Linfocitos T Virgenes  |
| LT <sub>0</sub> O | = Linfocitos T con cierto patrón de liberación de linfocinas   |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>NK</b>     | = Células Ascsinas Naturales  |
| <b>FP</b>     | = Periodo de Prepatencia  |
| <b>RCT</b>    | = Receptor de la Célula T   |
| <b>SE-ILK</b> | = Sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T, de aves inmunizadas contra <i>Salmonella enteritidis</i> , estimulados con concanavalina A |
| <b>SG-ILK</b> | = Sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T, de aves inmunizadas contra <i>S. gallinarum</i> , estimulados con concanavalina A.         |
| <b>SN</b>     | = Sobrenadante  |

## INMUNOPROFILAXIS Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LINFOCINAS, EN LA PROTECCION DE LA COCCIDIOSIS AVIAR

### INTRODUCCION

#### Coccidiosis Aviar:

Es la enfermedad parasitaria de mayor importancia en la industria avícola mundial, por sus grandes pérdidas económicas desde hace 30 años. Causada por un protozoo-parásito del género *Eimeria*, que se caracteriza por ser intracelular obligado, hospedador específico, ciclo de vida limitado, que induce en el hospedero, pérdida de peso, retardo en el crecimiento, despigmentación y mortalidad variable (McDougal y Reid, 1991; Moreno, 1989b), siendo las aves entre 4 y 6 semanas de vida, las principalmente afectadas (Wakelin *et al*, 1991; Rose *et al*, 1990; Moreno *et al*, 1992c). Sin embargo en nuestro país, existen 2 especies de coccidia altamente difundidas y que se presentan en mayor porcentaje en la industria avícola del pollo de engorda, que son: *Eimeria tenella* y *Eimeria acervulina*. (Moreno, 1992c).

#### Coccidiosis con alta mortalidad:

La *Eimeria tenella* es un protozoo-parásito que se caracteriza principalmente por causar lesiones espectaculares en ciegos, alta mortalidad y morbilidad, pérdida de peso entre otros signos. Parasita únicamente las células localizadas en el subepitelio del ciego, donde al 4º día del PP, los esquizontes de 2ª generación son ya maduros e inician la ruptura de los enterocitos con la consecuente aparición de hemorragias macroscópicas, hacia el 6º día del PP se inicia la liberación de ooquistes que después del día 7 del PP comienzan a declinar (McDougal y Reid, 1991; Moreno, 1989b; Bafundo, 1994). Otra característica importante es que es poco inmunogénica, lo que la hace un constante problema en las granjas, requiriendo mayor número de exposiciones a ooquistes, para inducir una respuesta eficaz (Bafundo, 1994; Stiff *et al*, 1993; Long *et al*, 1986c).

#### Control de la coccidiosis:

Dependiendo del número de ooquistes ingeridos y el grado de patogenidad de la cepa, resultaran la coccidiosis clínica o subclínica, siendo ésta última la más importante, por no presentarse los signos característicos y favorecer un brote clínico con todas sus secuelas (Moreno, 1989b; Moreno *et al*, 1980a).

Esto ha creado la elaboración de fármacos de síntesis química y de fermentación biológica, para el control de la enfermedad desde 1948, sin embargo los anticoccidianos de ambos grupos presentan limitantes como son: 1) Que no existe un fármaco que elimine a todas las especies existentes en el pollo y 2) El desarrollo de resistencia por parte de las coccidias, lo cual ha

inducido a la elaboración de diferentes estrategias en su uso, como son los programas duales, mezcla y rotación de anticoccidiano (McDougal y Reid, 1991; McDugal, 1994).

La elaboración de vacunas vivas, para establecer inmunidad en las aves, son utilizadas principalmente en gallinas reproductoras y pollas de postura para reemplazo, sin embargo su aplicación no es fácil, requiere de experiencia y tiene limitantes como: 1) Introducción de nuevas cepas a la granja, 2) Riesgo de crear un brote clínico y 3) Dependiendo del tipo de vacuna, podemos dejar susceptibles a las aves contra una especie de *Eimeria* (Moreno, 1984d; Moreno, 1985e).

#### Nuevas perspectivas de inmunización contra la coccidiosis:

Actualmente las investigaciones se están enfocando actualmente, a: 1) descubrir cuáles son los eventos involucrados en la resistencia del parásito hacia el hospedero; 2) cuáles son los mecanismos que utiliza el sistema inmunitario del ave, para establecer una inmunidad eficaz (Lillehoj y Trout, 1993); 3) Obtención y caracterización de antígenos de *Eimerias*, obtenidos a través de biología molecular, para obtener antígenos recombinantes de coccidia, que puedan ser usados como posibles vacunas (Lillehoj y Trout, 1993).

#### Inmunidad contra la coccidiosis aviar:

Para el caso de la coccidiosis aviar, se ha observado en estudios *in vivo* que dosis bajas y repetidas de *Eimeria tenella* y *Eimeria acervulina* producen una respuesta inmune en el ave, suficiente para soportar un desafío tardío con dosis altas de oocistos (Bafundo, 1993; Joyner and Norton, 1973; Long *et al*, 1986c; Nakai *et al*, 1992; Stiff y Bafundo, 1993). Otros estudios han mostrado que en el desarrollo de la inmunidad, la humoral está implícita en la respuesta, pero no es suficiente para establecer una respuesta inmune eficaz, donde esté implicada la inmunidad celular (Wakelin *et al*, 1991; Rose *et al*, 1990; Dinnington *et al*, 1992), incluso si hay diferentes haplotipos del CMH, no existe diferencia significativa en el incremento de la inmunidad humoral (Dinnington *et al*, 1992). El mecanismo de protección contra la coccidiosis aviar aún es desconocido, pero los trabajos ya se han iniciado para conocer el funcionamiento.

Los LT, confieren protección contra *Eimeria tenella*, por la secreción de linfocinas. Antiguamente, la forma de controlar a un microorganismo intracelular como la *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, era por extractos derivados de células de bazo, provenientes de hospederos inmunizados, utilizando como modelo a los ratones (Czuprinsky *et al*, 1985a; Czuprinsky *et al*, 1987b; Czuprinsky *et al*, 1988c). Recientemente ya existe evidencia sobre la inhibición de la coccidiosis, a través de las linfocinas (Long *et al*, 1971a; Klesius *et al*,

1983). Se ha descubierto que los LT provenientes de pollos inmunizados contra *Eimeria tenella* y estimulados con la Con-A (conocidas como *Eimeria tenella*-immune-lymphokines ET-ILK), secretan linfocinas que protegen a cultivos celulares de pollo, a las 48 h. pos-infección con *Eimeria tenella*, al reducir la invasión de esporozoítos a la célula huésped e inhibir el desarrollo intracelular (Kogut *et al*, 1987a), posteriormente en un ensayo *in vivo*, éstas mismas ET-ILK inoculadas IP a pollos de 14 días de edad y desafiadas 2 días después con una dosis subletal de *Eimeria tenella*, disminuyeron la severidad de lesión cecal, así como el número de oocistas cecales, lo cual no ocurrió con las linfocinas provenientes de aves no inmunizadas con *Eimeria tenella* (*Eimeria tenella*-Non Immune lymphokine, ET-NILK) (Kogut *et al*, 1988b). Las linfocinas provenientes de linfocitos T, disminuyen el número de oocistas en estudios *in vivo* con pollitos, e inhiben *in vitro* el desarrollo intracelular de *Eimeria tenella* y *Eimeria acervulina* ante desafíos homólogos (Lillehoj *et al*, 1989a). Otro estudio más minucioso, mostró que la mencionada protección *in vivo* e *in vitro*, conferida por las ET-ILK, se atribuye a linfocinas con peso molecular mayor a 10,000 Daltones y que, al diluir éstas, disminuye la inhibición del desarrollo del parásito dentro de la célula huésped y que su administración *in vivo* en dosis mayores a 0.1 ml/ave aumenta significativamente la protección al disminuir la severidad de lesiones cecales y el número de oocistas por ave. Este mismo estudio muestra que la administración IP hasta ahora, es la única vía que confiere protección, ya que en la administración intramuscular la protección se ve disminuida y el efecto es nulo cuando se utiliza la vía subcutánea (Kogut *et al*, 1992c).

La protección del ET-ILK han mostrado su eficacia *in vivo*, cuando son administradas a 30 minutos, 12, 24, 36 y 48 h. antes del desafío con *E. tenella*, lo cual no sucede si éstas son administradas 12 h. después del desafío (Kogut *et al*, 1992c).

#### Citocinas secretadas por linfocitos T:

En el humano y ratón, se han descubierto y caracterizado varias citocinas como IL-2, IL-3, IFN  $\gamma$ , FEC-GM y FNT entre otras (Abbas *et al*, 1994; Paul, 1993). Sin embargo, en medicina veterinaria, sólo se han caracterizado IL-8 e IL-2 en los bovinos (Sanbhara *et al*, 1988), IL-2 de felino (Bauer *et al*, 1988) e IL-2 de pollo (Myers *et al*, 1992).

#### Liberación de citocinas:

La liberación de citocinas se propicia por la presencia de un Ag, que inicia una cascada de eventos por parte del sistema inmunitario del hospedero. Primero es reconocido por una CPA, que lo procesa para presentarlo en su molécula de superficie de clase II (CMH II) al receptor de la célula  $T_HV$ , iniciándose así una comunicación entre células por receptores de membrana. A partir de este momento, se inicia otro tipo de comunicación entre las células, que es a través de



mediadores solubles denominados citocinas. Las primeras citocinas secretadas intervienen en la activación, crecimiento y diferenciación de los linfocitos T, entre ellas tenemos a la IL-2 producida por LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup> y CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, la IL-4 producida por LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Posteriormente son liberadas otras citocinas que regulan la inflamación, tal es el caso del IFN  $\gamma$  producido por LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> y por LT<sub>H10</sub>, el FNT<sub>2</sub> producida por LT activos, la IL-10 producida por LT<sub>H2</sub> y LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, la IL-5 es producida por LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Existe otra citocina liberada por los LT CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, que estimula el crecimiento y diferenciación de leucocitos inmaduros o FEC-GM (Abbas *et al*, 1994; Paul, 1993).

Las linfocinas del ET-ILK, inoculadas a pollitos de 14 días de edad, disminuyen la severidad de lesión cecal *in vivo* e inhiben el desarrollo del esporozoito en estudios *in vitro* (Kogut *et al*, 1992; Lillehoj *et al*, 1989). Se ha observado que las linfocinas provenientes de los LT estimulados con Con-A, activan a los macrófagos por un mecanismo aún no esclarecido, pudiendo ser uno de los responsables la presencia de IFN $\gamma$  (Lillehoj *et al*, 1989). Otros investigadores mostraron parcialmente la presencia de IFN en las ET-ILK, mediante su desnaturalización al ser tratado con 56°C por 30 minutos, 80°C por 10 minutos, a pH de 2 ó con tripsina (Kogut *et al*, 1992c), así como se ha descrito en otros SN con interferón (Lockhart, 1973; Grossberg, 1987). Más tarde otros investigadores obtuvieron un sobrenadante de LT de bazo de pollo, estimulados con Con-A, a una dosis de 10  $\mu$ g/ml y purificaron IFN que mostró interviene en la expresión del CMH II de monocitos de sangre periférica de pollo (Kaspers *et al*, 1994). Se ha identificado y caracterizado parcialmente IL-2 de pollo en SN obtenidos de LT estimulados con Con-A, a una dosis de 15  $\mu$ g/ml (Myers *et al*, 1992), pero también se reporta una dosis desde 2.5  $\mu$ g/ml de Con-A para su obtención (Gómez *et al*, 1995). Recientemente ya se identificaron IL-2 e IFN  $\gamma$  del SE-ILK y del SG-ILK, por Gómez (1995). El SE-ILK ha mostrado conferir protección a pollitos de 1 día de edad (McGruder *et al*, 1993a), 18 días de edad (Tellez *et al*, 1993a), así como a los 18 días de desarrollo embrionario (McGruder *et al*, 1995b) ante desafíos por *Salmonella enteritidis*, pero también existe protección al día de edad contra *S. gallinarum* (Wong *et al* 1994) y *S. typhimurium* (Ray *et al*, 1993), incluso contra *Eimeria tenella* en pollitos de 14 días de edad (García *et al*, 1995). El SG-ILK también ha mostrado conferir protección contra desafíos por *Salmonella gallinarum* (Tellez *et al*, 1994b). Los ET-ILK, SE-ILK y SG-ILK, han sido obtenidos a través de la estimulación con 7.5  $\mu$ g/ml de Con-A durante cultivo de LT a 41°C, 4% CO<sub>2</sub> por 48 h, donde los SE-ILK y SG-ILK han mostrado tener IL-2 e IFN  $\gamma$  (Gómez *et al*, 1995).

## HIPOTESIS

- 1) Las linfocinas provenientes de LT de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, inoculadas intraperitonealmente a pollitos de 14 días de edad, protegerán contra desafíos por *Eimeria tenella*, por más de 24 h de administradas.
- 2) El sobrenadante de linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, contiene IL-2.
- 3) El sobrenadante de linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, contiene IFN $\gamma$  y INF

## OBJETIVO GENERAL

1) Evaluación de la protección conferida por las linfocinas provenientes de LT de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, inoculadas intraperitonealmente a pollitos de 14 días de edad, a diferentes tiempos de desafío con una cepa de *Eimeria tenella*, y determinar la presencia de IL-2 y linfocinas que incrementen la expresión de moléculas del CMH.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1) Evaluación de la disminución de la severidad de lesiones macroscópicas del ciego, en aves desafiadas en forma independiente a los 3, 5 y 7 días con *Eimeria tenella*.
- 1.2) Evaluación en la disminución de la producción de ooquistes cecales, en aves desafiadas en forma independiente a los 3, 5 y 7 días con *Eimeria tenella*.
- 1.3) Identificar y cuantificar parcialmente la IL-2, en el sobrenadante de linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, a través de ensayos de proliferación celular, incorporando <sup>3</sup>H-timidina.
- 1.4) Identificar y cuantificar parcialmente linfocinas que incrementan la expresión de moléculas del CMH, en el sobrenadante obtenido a partir de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, utilizando AcM\* y citometría de flujo.

---

\* Los anticuerpos monoclonales fueron donados por el Dr. Jim Kauffman del Instituto Basel de Inmunología, Basilea, Suiza.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación de parásitos:

Se usó la cepa MOR-80 de *Eimeria tenella*, donada por el Dr. Reynaldo Moreno,\* los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se describe (Long *et al*, 1976b).

### Animales experimentales:

Se usaron 270 pollos de 14 días de edad para la evaluación de la severidad de lesiones cecales (estudio 1), así como 144 pollos para la evaluación del número de ooquistes (estudio 2). Las aves se recibieron al día de edad, en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México; se criaron juntos en piso hasta el día 13º de edad y a partir del día 14º de edad en adelante, las aves fueron lotificadas aleatoriamente. Las aves recibieron alimento con 22% P.C. y 2,900 Kcal de energía metabolizable/Kg, hasta la 4ª semana de edad y bajo restricción alimenticia natural, posteriormente sólo se modificó la dieta a 19% P.C. y 3,100 Kcal hasta la fase terminal del experimento. Todas las aves recibieron alimento con anticoccidiano (120 ppm de nicarbazina) desde el día de edad hasta 5 días antes de aplicar los desafíos. Se administró agua *ad libitum*.

### Animales para inmunización con *E. tenella* para la obtención del ET-ILK:

Se utilizaron pollos comerciales clínicamente sanos Avian Farn de 4 semanas de edad, criados en jaulas en baterías con calefacción, con agua y alimento *ad libitum*. (19% P.C. y 3,100 Kcal) sin anticoccidiano. Las aves fueron expuestas por *E. tenella*, durante 14 días, con una dosis de 1000 ooquistes/día/ave, que induce una inmunidad sólida en la protección de pollos (Joyner and Norton, 1973). Pasados 10 días de la última dosis, las aves fueron sacrificadas para la obtención de los bazos (Kogut *et al*, 1992).

### Preparación del ET-ILK:

La obtención de células de bazo, aislamiento de LT, producción y preparación de linfocinas, se realizó como lo describe la técnica (Kogut *et al*, 1992).

### Ruta de administración:

Se inoculó 1.0 ml/ave del ET-ILK por vía IP, a todos los pollos de 14 días de edad, que se encontraban en los grupos experimentales (Kogut *et al*, 1992).

---

\* Departamento de Producción Animal: Aves, F.M.V.Z.-U.N.A.M.

#### **Desafío con la capa MOR-80:**

En el experimento 1 (Evaluación de la severidad de lesión cecal), se utilizó una dosis única de 1,000 ooquistes/ave, la que produce severidad de lesión 1+ (Moreno *et al*, 1980a). Para el experimento 2 (Evaluación de ooquistes), se utilizó una dosis única de 200 ooquistes/ave.

#### **Diseños Experimentales del estudio *in vivo*:**

**Estudio 1:** Se evaluó la severidad de lesión cecal macroscópica al 4º día posterior al desafío por *Eimeria tenella* a todas las aves. El diseño experimental estuvo formado por 3 experimentos independientes (con 3 réplicas cada uno): a) Desafío con *Eimeria tenella* a los 3 días posinoculación del ET-ILK, b) Desafío por *E. tenella* a los 5 días posinoculación del ET-ILK y c) Desafío por *E. tenella* a los 7 días posinoculación de las ET-ILK. Cada uno de ellos a su vez con 3 tratamientos: 1) Testigo positivo (no tratado-desafiado), 2) Experimental (tratado-desafiado) y 3) Testigo negativo (no tratado-no desafiado). Se asignaron aleatoriamente 15 aves para cada repetición.

**Estudio 2:** Se evaluó el número de ooquistes cecales al 6º día posterior al desafío con *Eimeria tenella* en todos los grupos. El diseño experimental está formado por 3 experimentos independientes (con 3 réplicas cada uno): a) Desafío por *E. tenella* a los 3 días posinoculación del ET-ILK, b) Desafío por *E. tenella* a los 5 días posinoculación del ET-ILK y c) Desafío por *E. tenella* a los 7 días posinoculación del ET-ILK. Cada uno de ellos a su vez con 3 tratamientos: 1) Testigo positivo (desafiado-no tratado), 2) Experimental (desafiado-tratado) y 3) Testigo negativo (no desafiado-no tratado). Se asignaron aleatoriamente 5 aves por repetición.

#### **Evaluación de la severidad de las lesiones macroscópicas y número de ooquistes cecales:**

La severidad de las lesiones cecales fue evaluada como lo describen Johnson y Reid (1970). El conteo de ooquistes se realizó por el método de McMaster, tal como lo describe en su técnica Long (1976b).

#### **Análisis estadístico del experimento *in vivo*:**

Los resultados del conteo de ooquistes fueron sometidos a un ANDEVA para determinar las diferencias entre los tratamientos. Se usó la prueba de Scheffe para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre medias, mediante la utilización del paquete estadístico SAS (Luginbueke y Schlotzhauser, 1987). Para determinar las diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de las aves con o sin lesiones cecales se utilizó la prueba de  $\chi^2$  (Zar, 1984).

#### Preparación de linfoblastos para el ensayo de proliferación celular:

La obtención y preparación de las células de bazo se realizó como la describe la técnica (Gómez *et al*, 1995).

#### Ensayo de proliferación celular:

En una placa de cultivo celular (Nunc F96) de 96 pozos, se colocaron 200  $\mu$ l del ET-ILK en la primera línea de la placa y de C-63 respectivamente. A partir de ahí se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la dilución 1:512 por triplicado para ambos SN; seguidamente en cada pozo se colocaron 100  $\mu$ l de suspensión con los linfoblastos, dejándolos incubarse por 48 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al término de 48 h de incubación se incorporó a cada uno de los pozos 1  $\mu$ Ci de timidina marcada con tritio (Methyl-3H Dupont Boston) y se dejó en la placa por otras 24 h más de incubación (mismos parámetros). Finalmente las células fueron cosechadas en filtros de fibra de vidrio (Skatron instruments 11028 England) para contar la cantidad incorporada de timidina al ADN celular, a través de un contador de centelleo líquido (Beckman LS600SE, U.S.A.). Como testigo negativo se utilizó el C63, que no es específica para linfoblastos de ave, debido a la presencia de barrera de especie (Gómez *et al*, 1995).

#### Preparación de LT para el ensayo del CMH:

La obtención de LT se realizó como se describe en la técnica (Tellez *et al*, 1993a).

#### Ensayo para el incremento del CMH de pollo:

Se utilizaron linfoblastos de pollo, que fueron incubados por 24 h, 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en cajas de medio de cultivo (Nunc F96) con 10% y 20% de los ET-ILK, cada uno por triplicado. Al término del período de incubación, se utilizó la técnica descrita por Gómez (1993), para la determinación del incremento de moléculas de expresión de clase-I (Experimento 1),  $\beta_2m$  (Experimento 2) y clase-II (Experimento 3) del CMH, se utilizaron AcM de ratón IgG, anti-moléculas clase I (F21-2),  $\beta_2m$  (F21-21) y clase-II (2G11) del CMH de pollo, posteriormente fueron marcados con IgG de cabra anti-ratón (Gibco). La lectura se realizó por la medición de la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (FACSsort) del software LYSIS II (Becton Dickinson).

#### Análisis estadístico para el estudio *in vitro*:

Se utilizó un ANDEVA para determinar si hubo diferencias estadísticas en cada uno de los experimentos del CMH; para determinar cuáles fueron diferentes se usó la prueba de Scheffé del paquete estadístico SAS (Lugenburg y Schlotzhaue, 1987). Para el ensayo de proliferación se utilizó

una T-student para determinar diferencias significativas entre los grupos, así mismo se utilizó un análisis de regresión lineal para determinar el efecto de la dilución de las linfocinas del sobrenadante ET-ILK sobre la proliferación celular (Zar, 1984).

## RESULTADOS

En los resultados *in vivo* de ambos estudios, se presentan los datos promedios por réplicas y por grupos.

### Estudio 1

*Evaluación en la disminución de la severidad de lesiones macroscópicas.*

Evaluación del desafío a los 3 días posadministración del ET-ILK:

Se observaron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ( $P < 0.001$ ), que no presentó lesiones cecales (Cuadro 1).

Evaluación del desafío a los 5 días posadministración del ET-ILK:

Se observaron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ( $P < 0.001$ ), sin embargo, se observa una reducción parcial del 24% en la protección del grupo que recibieron las ET-ILK (Cuadro 1).

Evaluación del desafío a los 7 días posadministración del ET-ILK:

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibieron el tratamiento profiláctico con las ET-ILK ( $P > 0.05$ ), ya que el 100% de las aves presentó lesiones cecales (Cuadro 1).

### Estudio 2

*Evaluación de la disminución de la producción de ooquistes cecales.*

Evaluación del desafío a los 3 días posadministración del ET-ILK:

Las aves que recibieron el tratamiento profiláctico con las ET-ILK, mostraron una reducción significativa en el total de ooquistes cecales en comparación con el testigo positivo ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 2).

Evaluación del desafío a los 5 días posadministración del ET-ILK:

Hubo diferencias significativas entre las aves del grupo positivo y el que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK, al observarse la menor cantidad de ooquistes cecales en el grupo tratado con ET-ILK ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 2).

Evaluación del desafío a los 7 días posadministración del ET-ILK:

No hubo diferencias significativas entre las aves del grupo positivo y el que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ( $P > 0.05$ ), ya que presentaron la misma cantidad de ooquistes (Cuadro 2).

#### Resultados *in vitro*.

Ensayo para la expresión del CMH-I, por el ET-ILK.

##### *Expresión de la molécula $\alpha$ del CMH-I (Experimento 1).*

Se observaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% respectivamente del ET-ILK, en relación al testigo basal, al observar un incremento de la expresión de moléculas de clase-I de los LT de pollo. También hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el incremento de la expresión de moléculas del CMH-I entre la administración de 10% del ET-ILK, con respecto al adicionar el 20% (Figura 1).

##### *Expresión de moléculas $\beta_2$ m del CMH-I (Experimento 2).*

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% del ET-ILK, en relación al testigo basal, al observar un incremento de la expresión de moléculas de la  $\beta_2$  m de los LT de pollo. También se encontraron diferencias significativas en el incremento de la expresión de la molécula  $\beta_2$  m, al incrementar la cantidad de ET-ILK de 10 a 20% ( $P < 0.05$ ) (Figura 2).

##### *Expresión de moléculas de clase-II (Experimento 3).*

Se encontraron diferencias significativas entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% del sobrenadante del ET-ILK, con respecto al testigo basal ( $P < 0.05$ ). Sin embargo no hubo diferencias significativas en el incremento de la expresión de las moléculas de clase II entre los LT que recibieron 10 y 20% del sobrenadante ET-ILK ( $P > 0.05$ ) (Figura 3).

#### Ensayo de proliferación de linfoblastos, por el ET-ILK.

Se observó un incremento de proliferación estadísticamente significativo, en aquellos linfoblastos de pollo que recibieron el ET-ILK, a diferencia de los linfoblastos que recibieron el C-63 ( $P < 0.05$ ) en todas las diluciones (Figura 4). También se observó que si existe el efecto de dilución del ET-ILK, al disminuir la proliferación de linfoblastos ( $P < 0.001$ ) (Figura 5), lo cual no sucedió con el C-63 con una  $P > 0.05$  (Figura 6).



## DISCUSION

### Observación del efecto del ET-ILK:

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de protección conferida por los sobrenadantes provenientes de LT aislados de aves inmunes contra *Eimeria tenella* y que la actividad de éstos sobre sus células blanco en el huésped, es importante para el control de las *Eimerias spp* aviarias (Kogut *et al*, 1992; Lillehoj *et al*, 1989a; Long *et al*, 1971a; Klesius *et al*, 1983; Kogut *et al*, 1987a; Kogut *et al*, 1988b). Sin embargo el efecto profiláctico del ET-ILK, mostró ser de corta duración según nuestro estudio, ya que sólo se observan los efectos benéficos por un tiempo máximo de 5 días posteriores a la administración del ET-ILK, como se muestra en la disminución de lesiones cecales (Cuadro 1) y disminución del número de ooquistes (Cuadro 2).

Este corto período podría deberse a la vida media fisiológica de las citocinas y su regulación dentro del organismo aviar como sigue: a) Las citocinas son consideradas proteínas solubles de distintos pesos moleculares, que son sintetizadas por los LT ó LB; ambos tipos celulares son responsables de sintetizarlas bajo su propio código genético y no a través de otras células o por medio de proteínas extracelulares complementarias (Paul, 1993); b) Cada una tiene función específica, al adherirse a los receptores de la célula blanco (Abbas *et al*, 1994); c) Presentan una vida media corta, por ejemplo la IL-2 humana tiene una vida media inicial de 6 a 12 minutos y de 40 a 80 minutos en fase terminal (Anderson y Sorenson, 1994), la de ratón de 53 h. y la de pollo de 9.7 h. (Kromer *et al*, 1984); d) La liberación de las citocinas de su célula origen, depende del tiempo que se estimule a la célula receptora, que puede darse por estímulo a través de otra(s) citocina(s) o entre receptores de membrana, como el CMH y el RCT; e) Tiempo de presencia del Ag en el organismo, capaz de mantener activo al sistema inmune, permitiendo así la presencia de citocinas en el medio extracelular. (Paul, 1994; Abbas *et al*, 1994; Lydyard *et al*, 1993); f) Las citocinas que liberan los linfocitos  $T_H1$  son principalmente IL-2, IL-3, IFN  $\gamma$  y FEC-GM (Abbas *et al*, 1994), pero se sabe que también pueden secretar FNT (Hutchinson, 1993), a pesar de ser principalmente liberada por los macrófagos (Zhang *et al*, 1995; Abbas *et al*, 1994); cada una de ellas tiene funciones específicas al adherirse a su célula blanco: por ejemplo, la IL-2 estimula el crecimiento de los LT, NK y LB; la IL-3 estimula el crecimiento y diferenciación de todos los tipos celulares; el IFN  $\gamma$  activa a las macrófagos, células NK y células endoteliales, así como el incremento de las moléculas del CMH I y II de todas las células; el FEC-GM, propicia la diferenciación hacia granulocitos y fagocitos mononucleares e inicia el crecimiento y diferenciación de todas las líneas celulares; el FNT activa principalmente a los neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares y contribuye a la quimiotaxis de leucocitos al sitio de la inflamación (Abbas *et al*, 1994; Paul, 1994). Lo anterior hace suponer que el efecto protector por parte del ET-ILK, se deba a estas últimas funciones.

Se ha mostrado que los LT provenientes de aves inmunizadas contra *Eimeria maxima* secretan IFN y un FSC aún no clasificado (Byrnes *et al*, 1993). En otras especies como los bovinos, se ha observado que el IFN  $\gamma$  recombinante de bovino, inhibe la invasión de *Eimeria tenella* hacia cultivos *in vitro* (Kogut and Lange, 1989). Considerando que el IFN  $\gamma$  de humano y ratón, activa a los macrófagos y que éstos destruyen a protozoarios (Taverne *et al*, 1993), es posible suponer que estos fagocitos inonucleares, también puedan destruir a las *Eimerias sp* aviarias. No hay que descartar la posibilidad de que los heterófilos también podrían tener una importancia en el control de las *Eimerias sp* y que la posible presencia del FEC-GM esté involucrada.

#### *Presencia de linfocinas en el sobrenadante ET-ILK:*

Se conoce que los LT en las aves producen *in vitro* IL-2 e IFN a través de la estimulación con mitógenos como la Con-A (Fredericson y Sharma, 1987; Sambhara *et al*, 1988; Myers *et al*, 1992) y filohemoaglutinina (PHA) (Schnetzler *et al*, 1983) y por mezcla de aloantígenos (Efrat *et al*, 1982; Prowse y Pallister, 1989; Dijknans *et al*, 1990), de igual manera que en los mamíferos (Coligan *et al*, 1992; Cantrell y Smith, 1983). Así mismo se han detectado IL-2 e IFN  $\gamma$  de pollo en los SE-ILK y SG-ILK (Gómez *et al*, 1995). El ET-ILK, fue producido también a través de Con-A y densidades de  $1 \times 10^6$  células/ml, como se ha descrito (Tellez *et al*, 1993a; Gómez *et al*, 1995; Kogut *et al*, 1992c).

En el ensayo de proliferación, los resultados confirman la presencia de IL-2 al observar la proliferación de linfoblastos de pollo (Figura 4) y el efecto de las diluciones del ET-ILK (Figura 5), lo cual evidencia la existencia de una linfocina con funciones de proliferación celular, lo que concuerda con la actividad de IL-2, ya reportadas en otros SN de aves (Gómez *et al*, 1995), bovinos (Sambhara *et al*, 1988), felinos (Bauer *et al*, 1988) y en humanos y ratones (Fedelman, 1993; Paul, 1993; Abbas *et al*, 1994).

En el ensayo de la expresión del CMH, los resultados evidencian la presencia de IFN  $\gamma$  y posiblemente del FNT, en el ET-ILK (Figuras 1 a 3), al observar una de las funciones ya conocidas, como el incremento de moléculas de clase-I, E<sub>2m</sub> y clase-II del CMH de LT. La expresión de las moléculas del CMH de pollo, puede deberse al IFN  $\gamma$  y al FNT, ya que éstas han mostrado tener esta función en los humanos y ratones, en estudios independientes con citocinas (Hutchinson *et al* 1993; Paul 1993; Abbas *et al* 1994); sin embargo a través de SN crudos de LT estimulados con Con-A, no se ha reportado la presencia de FNT, como la principal linfocina producida. Los estudios con el uso de Con-A y densidades celulares de LT aviarias de  $1 \times 10^7$ /ml,

reportan al IFN como una linfocina mayormente encontrada (Efrat *et al*, 1982; Prowse y Pallister, 1989), evidenciando su presencia a través de ensayos de actividad viral (Weiler y Bulow, 1987; Dijkmans *et al*, 1990), activación de macrófagos (Dijkmans *et al*, 1990; Kaspers *et al*, 1994) e incremento de moléculas de clase II en los monocitos aviares (Kaspers *et al*, 1994).

Con base a la información actual, se supone que el incremento en la expresión de moléculas del CMH es responsabilidad principal del IFN  $\gamma$  y en menor grado el FNT que pudiera estar presente en el ET-ILK, por los siguientes puntos: a) Únicamente el IFN  $\gamma$  es producido por los LT (Vilcek, 1992; Paul, 1993); b) La producción de FNT no es reportada en cultivos de LT de pollo estimulados con Con-A a densidades celulares de  $1 \times 10^7$ /ml (Fredericson y Sharma, 1987; Sambhara *et al*, 1988; Myers *et al*, 1992); c) El FNT se produce principalmente a través de lipopolisacáridos bacterianos (Tracey y Cerami, 1992; Abbas *et al*, 1994); d) El FNT es producido principalmente por macrófagos y monocitos, además de los LB, LT, NK y células gliales (Tracey y Cerami, 1992); e) El FNT actualmente se clasifica como una citocina liberada en las fases agudas de la infección y que desencadena la producción de IL-1 e IL-6 (Abbas *et al*, 1994).

Con base en lo anterior, es de suponer que el incremento de la expresión de moléculas de clase-I,  $\beta_2$ m y clase-II del CMH que se observó en los estudios *in vitro*, evaluados mediante citometría de flujo, deba de ser mediado principalmente por el IFN  $\gamma$ .

Estudios para clonar el gene que codifica al IFN  $\gamma$  y la producción de IFN  $\gamma$  recombinante de pollo, se encuentran en proceso en los laboratorios (Departamento de Producción Animal: Aves de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. y el Laboratorio de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI). Su desarrollo permitirá entre otras cosas, la producción de AcM con los que se podrá comprobar definitivamente éstas hipótesis.

## CONCLUSIONES

- I. Las linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, confieren protección ante desafíos con bajo número de oocistos esporulados de *Eimeria tenella*, por un tiempo máximo de 5 días posinfección.
- II. Entre las linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con Con-A, se encuentran interleucina-2, IFN  $\gamma$  y posiblemente de FNT.
- III. Se evidenció la presencia de moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad en linfocitos T de ave.
- IV. Se observó el incremento de la expresión de moléculas del CMH I y II, como una de las funciones del IFN  $\gamma$  de pollo.
- V. Se demostró la función de proliferación celular de la IL-2, con respecto a otras especies.

#### LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.: Cellular and Molecular Immunology. 2th, ed. Saunders press, Philadelphia, U.S.A. 1994.
- Anderson, P.M. and Sorenson, M.A.: Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. Clinical Pharmacokinetics 27:1-8 (1994).
- Bafundo, K.W.: Aplicación práctica de vacunas con oocistos vivos en la avicultura comercial. Memorias del VIII Seminario Internacional de Patología Aviar. Universidad de Athens Georgia y AMEVEA Athens Georgia 1994. 285-296. Athens Georgia (1994).
- Bauer, R.M. and Olsen, R.G.: Parameters of production and partial characterization of feline interleukin-2. Vet. Immun. and Immunopathol. 19:173-183 (1988).
- Byrnes S., Emerson, K and Kogut M.: Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony-stimulating factors and Interferon. Immun. and Med. Microbiol. 6:45-52 (1993).
- Cantrill, D.A. and Smith, K.A.: Transient expression of IL-2 receptors: consequences for T-cell growth. J. Exp. Med. 158:1895-1898 (1983).
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevack, E.M., Strober, W.: Current Protocols in Immunology. Vol. 1 Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. 1992.
- Czuprynski, C.J. and Brown, J.F.: Recombinant murine interleukin-1 alfa enhancement of nonspecific antibacterial resistance. Infect. and Immunol. 55:2061-2065 (1987b).
- Czuprynski, C.J., Brown, J.F., Young, K.M., Cooley, A.J., and Kurtz, R.S.: Effects of murine recombinant interleukin-1 alfa on the host response to bacterial infection. J. Immunol. 140:962-968 (1988c).
- Czuprynski, C.J., Henson P.M. and Campbell P.A.: Enhanced accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages by transfer of T cells from mice immunized with *Listeria monocytogenes*. J. Immunol. 134:3449-3454 (1985a).
- Dunnington, E.A., Gross, W.B., Martin, A. and Siegel, P.B.: Response to *Eimeria tenella* of chickens selected for high or low antibody response and differing in haplotypes at the major histocompatibility complex. Avian Diseases 36:49-53 (1992).
- Dijkman, R., Creemers, J. and Billiau, A.: Chicken macrophage activation by Interferon: do birds lack the molecular homologue of mammalian Interferon-gamma? Vet. Immunol. and Immunopathol. 26:319-332 (1990).
- Efrat, S., Filo, S. and Kaempfer, R.: Kinetics of induction and molecular size of mRNAs encoding human interleukin-2 and gamma-Interferon. Nature 297:236 (1982).
- Fedelman, M.: Cell cooperation in the antibody response. in Immunology. 3th ed. edited by Roitt, L.M., Brostoff, J., Male, D. 7-7.14. Mosby. Hong Kong 1993
- Fredricksen, T.L. and Sharma, J.M.: Purification of avian T cell growth factor and immune Interferon using gel filtration high resolution chromatography. In Avian Immunology, edited by Weber W.Y. and Ewert D.L. Alan R. Liss New York. 1987.

García, E.G., Tellez, I.G., Casaubon, H.M., Moreno, D.R., Kogut, M.H. y Hargis, B.M.: Evaluación de la protección conferida por linfoquinas obtenidas de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* ante un desafío por *Eimeria tenella*, en pollos de engorda. Memorias de la XX Convención Anual ANECA, Acapulco Guerrero México D.F. 1995. 100-106. México D.F. (1995).

Gerrard, T.L., Dyer, D.R., Zoon, K. C., Nedden, D.Z. and Siegel, J.P.: Modulation of class I and class II histocompatibility antigens on human T cell lines by IFN-gamma. J. Immunol. **140**:3450-3456 (1988).

Gómez, V.G.: Identificación de linfoquinas en sobrenadante de linfoblastos de pollo estimulados con Con-A. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1995.

Grossberg, S.E.: Interferóns: an overview of their biological and biochemical properties. In Mechanisms of Interferon Inducers Actions editada by Pfeffer L.M. Vol. 1. 1-32. CRC Press, (1987).

Hutchinson, Y.: Transplantation and Rejection. In IMMUNOLOGY edited by Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 3th ed. 16.-22. Mosby/Mandarin offset Hong Kong 1993.

Johnson, J. and Reid, W.M.: Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Exp. Parasitology **28**:30-36 (1970).

Joyner, L.P. and Norton, C.C.: The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. Parasitol. **67**:333-340 (1979).

Kaspers, B., Lillehoj, H.S., Jerjins, M.C. and Pharr, G.T.: Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. Vet. Immun. and Immunopathol. **44**:71-84 (1994).

Klesius, P.H., and Giambrone, J.J.: Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. Poultry Science **63**:1333-1337 (1983).

Kogut, M.H. and Lange, C.: The role of lymphokines on the protective immunity of chickens to *Eimeria tenella*. Poultry Science **66**:128 (1987a).

Kogut, M.H. and Lange C.: Recombinant Interferon-gamma inhibits cell invasion by *Eimeria tenella*. J. of Interferon Research **9**:67-77 (1989d).

Kogut, M.H., Slajchert, T., Scott, H.M., and Lange, C.: Protection of chickens from infection with *Eimeria tenella* following the *in vivo* administration of immune lymphokines. Poultry Science **67**:Suppl. 1, pp 105 (1988b).

Kogut, M.H. and Slajchert, T.: T-lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. Immunol. and Infect. Diseases **2**:69-79 (1992c).

Kromer, G., Schauenstein, K. and Wick, G.: Avian lymphokines: An improved method for chicken IL-2 production and assay. A Con A-erythrocyte complex induces higher T-cell proliferation and IL-2 production than does free mitogen. J. Immunol. Methods **73**:23-27 (1984)

Lillehoj H.S., Kang, S.Y., Keller, L. and Sevoian, M.: *Eimeria tenella* and *E. acervulina*: lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma and sporozoite-stimulated immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. Experimental parasitology **69**:54-64 (1989a).

Lillehoj, H.S. and Trout, J.M.: Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Pathology 22:3-31 (1993b).

Lockhart, R.Z., Jr.: Criteria for acceptance of a viral inhibitor as an Interferón and a general description of the biological properties of Known Interferóns. edited by Interferóns and Interferón Inducers. 11-27. Elsevier Publishing Co. 1973.

Long, P.L., y Milne, B.S.: The effect of an Interferón inducer on *Eimeria maxima* in the chicken. Parasitology 62:295-302 (1971a).

Long, P.L., Millard, B.J., Joyner, L.P. and Norton, C.C.: A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Veterinaria Latina Vol:VI(3) 201-217. (1976b).

Long, P.L., Johnson, J., McKenzie, M.E., Perry, E., Crane, M.St., and Murray, P.K.: Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. Avian Pathol. 15:271-278 (1986c).

Luginbuck, R.C. and Schlotzhauser, D.: SAS/STAT guide for personal computers. 6th, 555-573. SAS Institute, Cary, N.C. 1987.

Lydyard, P. and Grossi, C.: Development of the immune system. In Immunology edited by Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 3th ed. 16.-16.22. Mosby Mandarin offset Hong Kong 1993.

McDugal, L.: Testigo de la coccidiosis en el siglo XXI. Memorias del VIII Seminario Internacional de Patología Aviar. Universidad de Athens Georgia y AMEVEA. 1994. 275-284. Athens Georgia (1994).

McDougal R.L. and Reid, M.W.: Coccidiosis. In Diseases of Poultry. Edited by Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M., Yoder Jr, H.W. 9th. pp 780-787 Iowa State University Press. Ames Iowa. U.S.A. 1991.

McGruder, E.D., Ray, P.M., Tellez, I.G., Kogut, M.H., Currier, D.E., Deloach, J.R. and Hargis, B.M.: *Salmonella enteritidis* immune leucocyte-stimulated soluble factor: Effects on increased to Salmonella organ invasion in day-old leghorn chicks. Poultry Science 73:2264-2271 (1993a).

McGruder, E.D., Ramirez, G.A., Kogut, M.H., Moore, R.W., Corrier, D.E., Deloach, J.R. and Hargis, B.M.: *In ovo* administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella enteritidis* organ infectivity. Poultry Science 74:18-25 (1995b).

Myers, T.J., Lillehoj, H.S. and Fettere, R.H.: Partial purification and characterization of chicken interleukine-2. vet. Immun. Immunopathol. 34:97-114 (1992).

Moreno, D.R., Quiróz, R.H. and Mosqueda, T.A.: Patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. Rev. Vet. Mex. 2:1-7 (1980a).

Moreno, D.R.: Enfermedades Parasitarias de las Aves, Tomo II. 2ª edición. Fac. Med. Vet. Zoot., de la UNAM, México D.F. 1989b.

Moreno D.R. Endoparásitos mas frecuentes en las gallinas. Memorias de la III Jornada Médico Avícola. 146-148 Fac. Med. Vet. Zoot de la UNAM México D.F. 1992c

ESTA TESIS NO DEBE  
VALER DE LA BIBLIOTECA

Moreno D.R.: Pruebas preliminares de inmunización contra la coccidiosis de las aves. IX Convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas ANECA A.C. Guanajuato Gto. 1984. 16-26 ANECA A.C. (1984d).

Moreno D.R.: Ventajas del empleo de la vacuna contra la coccidiosis de las gallinas. X Convención anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas ANECA A.C; IX Congreso Latinoamericano de avicultura; XXIV Congreso Nacional de Avicultura, Acapulco Gro. México D.F. 639-644. ANECA A.C. 1985e.

Nakai, Y., Uchida, T. and Karazawa, K.: Immunization of young chickens by trycle infection with *Eimeria tenella*. Avian Diseases 36:1034-1036 (1992).

Prowse, S.J. and Pallister, J.: Interferón release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. Avian Pathol. 16:439-442 (1989).

Paul, W.E.: Fundamental Immunology. 3th ed. edited by Raven press. LTD New York 1993.

Ray, P.M., McGruder, E.D., Kogut, M.H. and Hargis, B.M.: The specificity of *Salmonella enteritidis* immunolymphokine and its protection against other *Salmonella* serovars in day-old leghorn chicks. American Association of Immunologists and the Clinical Immunology Society, Annual meeting. Denver C.O. (1993).

Rose, M.E. and Wakelin, D. Mechanisms of immunity to coccidiosis. In *Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs*. edited by Yvone P. Proceedings of the 5<sup>o</sup> Internacional Coccidiosis Conference. INRA Tours France 1989. 527-540. Tours France (1989).

Stiff, M.I. and Bafundo, K.W.: Devolment of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria*. Avian Diseases 37:295-301 (1993).

Sambhara, S.R. and Belden, E.L.: Bovine interleukine-2: Production and characterization. Vet. Immun. Immunopathol. 18:165-172 (1988).

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

Taverne, J.: Immunity to Protozoans and worms. In Immunology edited by Roitt, Y., Brostoff, J., Male, D. 3th ed. 16-16.22. Mosby. England 1993.

Tellez, I.G., Kogut, M.H. and Hargis, M.B.: Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in leghorn chicks. Avian Diseases 37:1062-1070 (1993a).

Tellez, I.G., Wong, G.R., Isibasi, A.A., Ortiz, N. V, Kogut, M.H., McGruder, E.D. y Hargis, B.M.: Linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella gallinarum* confieren protección contra la infección de *S. gallinarum* en pollos de engorda. Memorias de la XIX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Puerto Vallarta Jal. México D.F. 322-326 ANECA A.C. México D.F. (1994b).

Tracey, K.J. and Cerami, A.: Interferon-gamma. In Encyclopaedia of Immunology. edited by Roitt, I.M. Vol II, United States edition published by academic press Inc. Sn Diego CA 1992.

Vilcek, J.: Encyclopaedia of Immunology. edited by Roitt, I.M. Vol II, United States edition published by academic press Inc. Sn Diego CA 1992.



Wakelin, D. and Rose, M.E. Immunity to coccidiosis. In: PE, ed Coccidiosis of Man and Domestic Animals CRC Press, 281-306 London England 1991.

Weiler, H. and Bulow, V.: Development of optimal conditions for lymphokine production by chicken lymphocytes. Vet. Immunol. and Immunopathol. 14:257-267 (1987).

Wong, G.R.: Evaluación de las linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *S. enteritidis* en la inmunoprofilaxis contra la infección de *S. gallinarum* en pollos de engorda. Tesis de licenciatura, *Fac. de Med. Vet. y Zool.* Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1994.

Zhang, S., Lillehoj, H.S. and Ruff, M.D.: Chicken Tumor Necrosis-Like Factor: *In vitro* production by macrophages stimulated with *Elmeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. E.Science. 74:1304-1310 (1995).

Zar, J.: Biostatistical analysis, 2th ed. Prentice-Hall Inc. 384-351. Englewood Cliffs, N.J. 1984.

Cuadro 1. Evaluación de la disminución de la severidad de lesión cecal al 4º día del período de prepatencia de *Eimeria tenella*, en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con concanavalina A (ET-ILK), 3 días<sup>a</sup>, 5 días<sup>b</sup> y 7 días<sup>c</sup> antes del desafío respectivamente <sup>f</sup>.

| Tratamientos                         | Experimentos                  |                          |                               |                          |                               |                          |                               |                          |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|                                      | Repetición 1                  |                          | Repetición 2                  |                          | Repetición 3                  |                          | Combinado                     |                          |
|                                      | Severidad/Lesión <sup>d</sup> | Número/Aves <sup>e</sup> | Severidad/Lesión <sup>d</sup> | Número/Aves <sup>e</sup> | severidad/Lesión <sup>d</sup> | Número/Aves <sup>e</sup> | Severidad/Lesión <sup>d</sup> | Número/Aves <sup>e</sup> |
| <sup>a</sup> No tratado-Desafiado    | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 45/45 *                  |
| <sup>a</sup> Tratado-Desafiado       | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 45/45 **                 |
| <sup>a</sup> No tratado-No desafiado | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 |
| <sup>b</sup> No tratado-Desafiado    | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 45/45 *                  |
| <sup>b</sup> Tratado-Desafiado       | 1+                            | 03/15 **                 | 1+                            | 04/15 **                 | 1+                            | 04/15 **                 | 1+                            | 11/45 **                 |
| <sup>b</sup> No tratado-No desafiado | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 45/45 **                 |
| <sup>c</sup> No tratado-Desafiado    | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 45/45 *                  |
| <sup>c</sup> Tratado-Desafiado       | 1+                            | 14/14 *                  | 1+                            | 15/15 *                  | 1+                            | 14/14 *                  | 1+                            | 43/43 *                  |
| <sup>c</sup> No tratado-No desafiado | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 15/15 **                 | 0                             | 45/45 **                 |

<sup>d</sup> La severidad de lesión está expresado por la escala de Johnson & Reid.

<sup>e</sup> Se reporta el número de aves que presentan las lesiones por cada grupo y prueba. Los valores seguidos por difente número de asteriscos son estadísticamente significativos, por la prueba de Ji<sup>2</sup> (P < 0.001).

<sup>f</sup> Las aves fueron desafiadas con una dosis única de 1000 ooquistes esporulados/ave

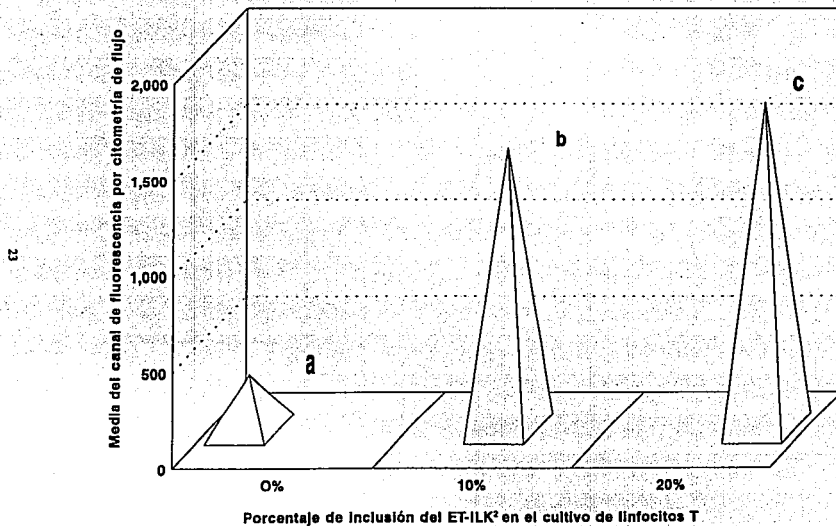
Cuadro 2. Evaluación de la disminución del número de ooquistes al 6° día del período de prepatencia de *Eimeria tenella*, en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con concanavalina A (ET-ILK), 3 días<sup>a</sup>, 5 días<sup>b</sup> y 7 días<sup>c</sup> antes del desafío respectivamente<sup>e</sup>.

| Tratamiento                          | Experimentos                           |  |  |                                     |
|--------------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
|                                      | Repetición 1<br>Ooquistes <sup>d</sup> | Repetición 2<br>Ooquistes <sup>d</sup> | Repetición 3<br>Ooquistes <sup>d</sup> | Combinado<br>Ooquistes <sup>d</sup> |
| <sup>a</sup> No tratado-Desafiado    | 6,400 *                                | 5,600 *                                | 8,000 *                                | 6,666 *                             |
| <sup>a</sup> Tratado-Desafiado       | 800 ***                                | 0 ***                                  | 800 ***                                | 533 ***                             |
| <sup>a</sup> No tratado-No desafiado | 0 ***                                  | 0 ***                                  | 0 ***                                  | 0 ***                               |
| <sup>b</sup> No tratado-Desafiado    | 6,400 *                                | 6,400 *                                | 6,400 *                                | 6,400 *                             |
| <sup>b</sup> Tratado-Desafiado       | 1,600 **                               | 3,200 **                               | 4,000 **                               | 2,933 **                            |
| <sup>b</sup> No tratado-No desafiado | 0 ***                                  | 0 ***                                  | 0 ***                                  | 0 ***                               |
| <sup>c</sup> No tratado-Desafiado    | 7,200 *                                | 6,400 *                                | 8,800 *                                | 7,466 *                             |
| <sup>c</sup> Tratado-Desafiado       | 7,200 *                                | 6,400 *                                | 8,800 *                                | 7,466 *                             |
| <sup>c</sup> No tratado-No desafiado | 0 ***                                  | 0 **                                   | 0 ***                                  | 0 ***                               |

<sup>d</sup> El número de ooquistes/g/ave se determinó por la prueba de McMaster, y se reporta el promedio, por grupo y por prueba. Los valores seguidos por diferente número de asteriscos son diferentes estadísticamente, por la prueba de Scheffe (P < 0.05).

<sup>e</sup> Las aves fueron desafiadas con una dosis única de 200 ooquistes esporulados/ave

Figura 1. Evaluación de linfocinas<sup>1</sup> en el ET-ILK<sup>2</sup>, a través del incremento en la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T

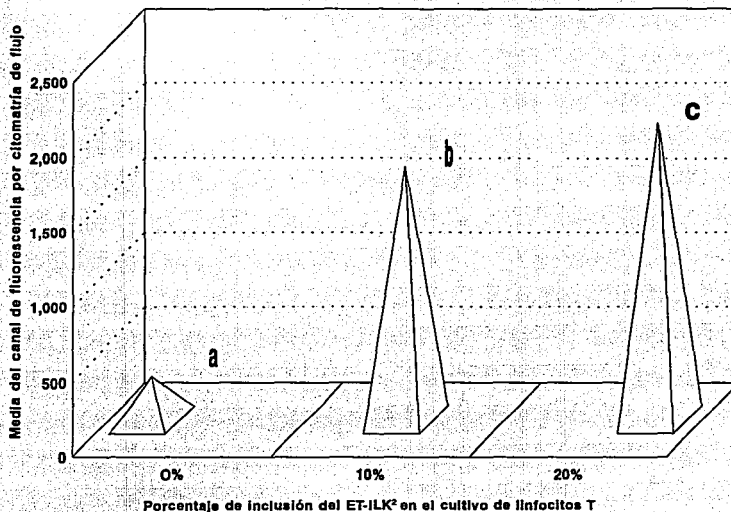


<sup>1</sup> Interferon-gamma y Factor Necrosante de Tumores (FNT)

\* Grupos con diferentes literales, indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ )

<sup>2</sup> Sobrenadante de linfocitos T de aves inmunes contra *E.tenella*, estimulados con concanavalina A

Figura 2. Evaluación de linfocinas<sup>1</sup>, en el ET-ILK<sup>2</sup> a través del incremento en la expresión de moléculas  $\beta_2m$  del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T

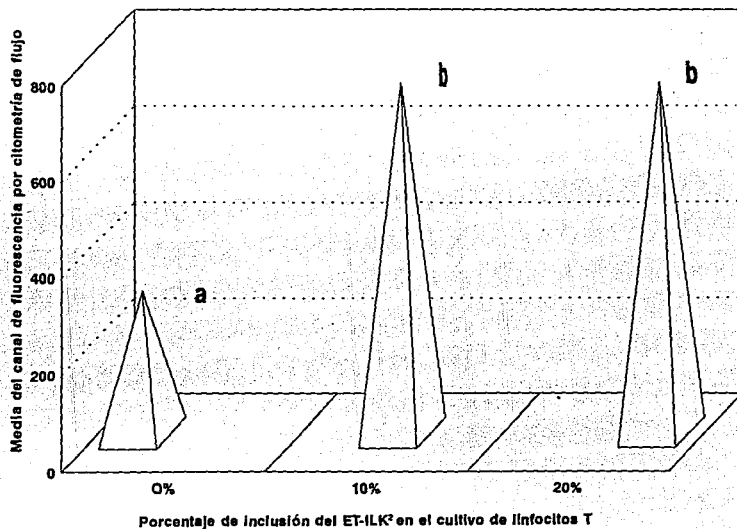


<sup>1</sup> Interferon-gamma y Factor Necrosante de Tumores (FNT)

\* Grupos con diferentes literales, indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ )

<sup>2</sup> Sobrenadante de linfocitos T de aves inmunes contra *E.tenella*, estimulados con concanavalina A

Figura 3. Evaluación de linfoquinas<sup>1</sup>, en el ET-ILK<sup>2</sup> a través del incremento en la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos T

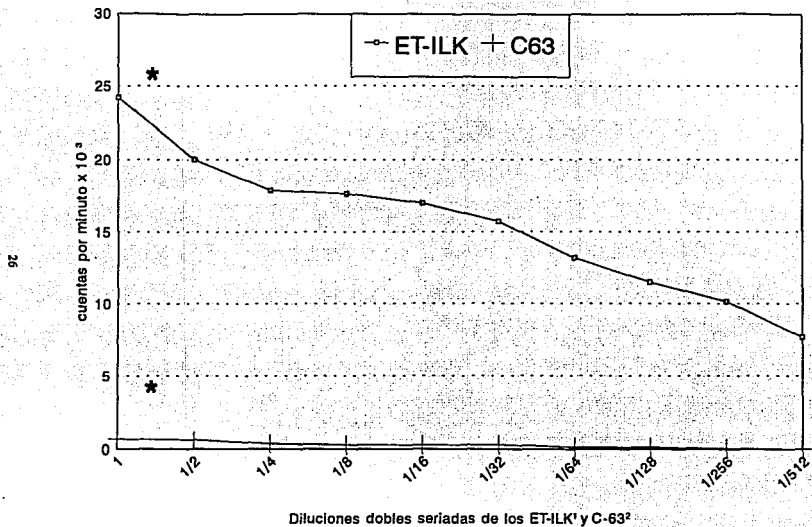


<sup>1</sup> Interferon-gamma y Factor Necrosante de Tumores (FNT)

\* Grupos con diferentes literales, indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ )

<sup>2</sup> Sobrenadante de linfocitos T de aves inmunes contra *E.tenella*, estimulados con concanavalina A

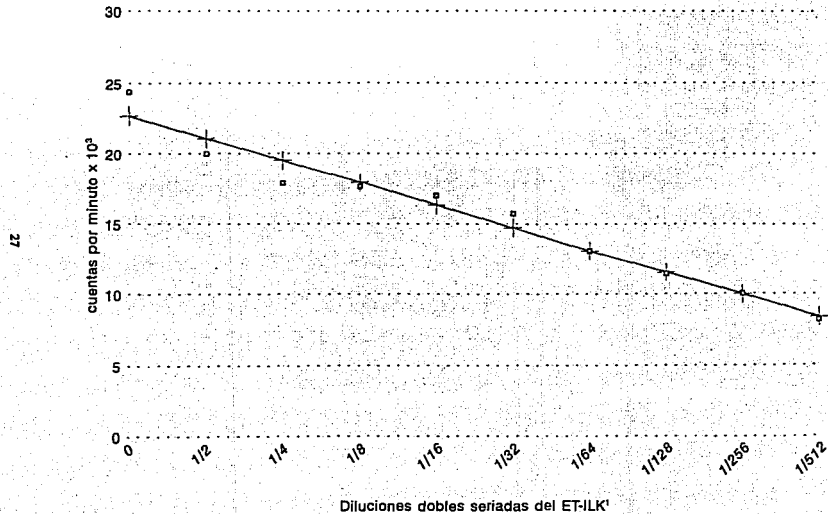
Figura 4. Evaluación de Interleucina-2 en el ET-ILK<sup>1</sup> a través de la proliferación de linfoblastos de pollo, con respecto a la Interleucina-2 de ratón (C-63)<sup>2</sup>.



<sup>1</sup> Sobrenadante de linfocitos T de aves inmunes contra *E.tenella*, estimulados con concanavalina A

<sup>2</sup> Diferencias estadísticas significativas entre los dos grupos, utilizando la prueba de Scheffe (P < 0.05)

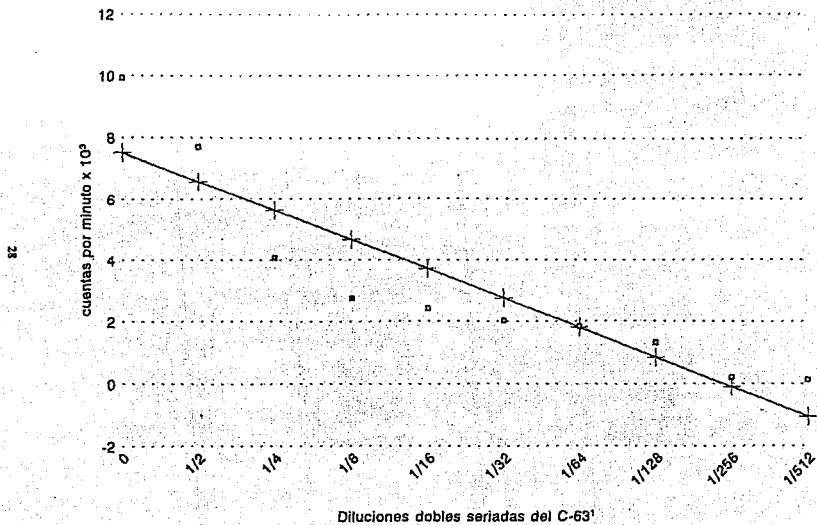
**Figura 5. Efecto de las diluciones sobre el sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella*, estimulados con concanavalina A (ET-ILK)<sup>1</sup> sobre la proliferación de linfoblastos de pollo**



Fórmula de regresión  
 $y = 17938 - 23.62 x_i$   
 $r = -0.79$  ( $P < 0.001$ )



**Figura 6. Efecto de las diluciones sobre el sobrenadante de Interleucina-2 de ratón (C-63)<sup>1</sup> sobre la proliferación de linfoblastos de pollo**



Fórmula de regresión  
 $y = 4384.15 - 11.21 x_i$   
 $r = -0.57$  ( $P > 0.05$ )