



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

15
24

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INMUNOPROFILAXIS MEDIANTE LA
ADMINISTRACION IN OVO DE LINFOCINAS
PROVENIENTES DE LINFOCITOS T DE AVES
INMUNES vs *Eimeria tenella*, EN POLLOS DE
ENGORDA DE UN DIA DE EDAD

T E S I S

PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

POR

JOSE JESUS CABRIALES JIMENEZ

Asesores: MVZ, MC Gary García Espinosa
MVZ, PhD Guillermo Téllez Isaías
MVZ, EPA: A José A. Quintana L.
PhD Michael Kogut



TESIS CON F.
FALLA DE ORIGEN

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**INMUNOPROFILAXIS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN *IN OVO* DE
LINFOCINAS PROVENIENTES DE LINFOCITOS T DE AVES INMUNES
vs Eimeria tenella, EN POLLOS DE ENGORDA DE UN DÍA DE EDAD**

Tesis presentada ante la
división de estudios profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del Título de
Médico Veterinario Zootecnista
Por:

José Jesús Cabriales Jiménez

Asesores:

MVZ, MC Gary García Espinosa.

MVZ, PhD Guillermo Téllez Isaías.

MVZ, EPA:A José Antonio Quintana López.

PhD Michael Kogut.

México, D.F.

1996

DEDICATORIA

- A mis Padres: *Sr. José Cabriales y Sra. Sara Jiménez.* Por toda una vida llena de esfuerzo y sacrificios para darles a sus hijos la mejor herencia: Su Educación. ¡ Los Quiero y Admiro !
- A mi Hijo: *Raziel T. Cabriales Hirata.* Eres la razón que me motiva a seguir adelante.
- A mi Esposa: *C.D. Yuritzi Hirata,* Eres lo mejor que me ha dado la vida y sin tu comprensión y apoyo en todo momento no hubiese llegado hasta donde estoy. ¡TE AMO!
- A mis Hermanos: *Lic. César R. Cabriales, Roel y Sandra Cabriales.* El compartirse conmigo me hace aquilatar el gran tesoro que tengo en mi familia: Ustedes.
- A mis Suegros: *Sr. Guillermo Hirata y Sra. Marisela Ramírez.* Por toda su incondicional ayuda que han brindado para nuestra preparación.
- A mis Amigos: *Raúl Rico; Rubén Bentéz; MVZ Roberto Beltrán; MVZ Osbaldo Cruz; MVZ Edgar Ocampo; MVZ Beatriz Salas; MVZ M^a. del Pilar De Jesús y MVZ Ana Palomares.* Por Todo lo que han contribuido para mi formación..... ¡Lo Logré ! (Si, Si!).

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la satisfacción y el orgullo de ser universitario.

A todo el personal que conforma el Departamento de Producción Animal: Aves, por brindarme la oportunidad de pertenecer a un magnífico equipo de trabajo.

Al MVZ, MC Gary García y al Pl D. Guillermo Téllez Isafas; gracias por creer en mí y por compartir su conocimiento enseñando a la gente que les rodea.

Al MVZ, MC Miguel Angel Cenicerros, a la MVZ Xóchitl Hernández y a la MVZ Donaji García. El apoyo que me brindaron fué crucial para poder llegar donde estoy. ¡Gracias, mill!

Al MVZ, EPA:A José Antonio Quintana López . Por sus valiosas sugerencias para la realización de esta tesis.

Al Sr. José González, a la MVZ Ma. Luisa Calderón y al MVZ Julio Alfaro, por la gran ayuda prestada en la elaboración de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
Coccidiosis aviar.....	2
Control de la coccidiosis aviar.....	2
Inmunoprofilaxis: vacunación vs coccidiosis.....	3
Mecanismos de inmunidad vs coccidiosis aviar.....	4
Citocinas.....	5
Redes de citocinas.....	5
El papel de las citocinas en la respuesta inflamatoria.....	6
Utilización de las citocinas.....	7
Citocinas producidas por los linfocitos T.....	7
Administración <i>in ovo</i> de linfocinas.....	8
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS	
Preparación de la cepa de <i>E. tenella</i> para desafío.....	11
Animales de experimentación.....	11
Animales para inmunización para la obtención de linfocinas.....	11
Preparación de la suspensión de células esplénicas.....	11
Aislamiento de linfocitos T.....	12
Preparación de Linfocinas.....	12
Administración de Linfocinas.....	13
Desafío con la cepa MOR-80.....	13
Evaluación de la severidad de las lesiones macroscópicas y número de ooquistes cecales.....	13

Diseño experimental.....	14
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	22
LITERATURA CITADA.....	23
CUADROS.....	27
ANEXO.....	29

RESUMEN

CABRIALES JIMÉNEZ JOSÉ JESÚS. Inmunoprofilaxis mediante la administración *in ovo* de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes vs *Eimeria tenella*, en pollos de engorda de un día de edad. (Bajo la asesoría de: MVZ, MC. Gary García Espinosa; MVZ, PhD. Guillermo Téllez Isajas; MVZ, EPA: A José Antonio Quintana López y PhD. Michael Kogut.)

En el presente trabajo fué evaluada la administración *in ovo* de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella* (ET-ILK), como método profiláctico, ante un desafío con *E. tenella* en pollitos de un día de edad. Se evaluó la disminución de la severidad de lesiones macroscópicas al cuarto día post-desafío, en pollitos inoculados con ET-ILK al día 18 de la embriogénesis y desafiados al primer día de edad con 30,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*. También se evaluó la disminución de la producción de ooquistes al sexto día post-desafío, en pollitos inoculados con ET-ILK al día 18 de la embriogénesis y desafiados al primer día de edad con 500 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Mediante la vía de administración *in ovo* se depositaron 0.20 ml de ET-ILK en cavidad amniótica. Las linfocinas utilizadas fueron obtenidas del sobrenadante de linfocitos T en activación con Concanavalina A, provenientes de aves hiperinmunizadas vs *E. tenella*. Los resultados observados muestran que la administración *in ovo* de ET-ILK al día 18 del desarrollo embrionario no confieren protección ante un desafío por *E. tenella* al día de edad, ya que no hubo disminución en el grado de lesiones macroscópicas al 4° día post-desafío ($P > 0.05$), ni tampoco hubo disminución en la producción de ooquistes al 6° día post-desafío ($P > 0.05$). Esta falta de protección puede deberse a la influencia de varios factores tales como: la vía de administración de las linfocinas; la cantidad de estas linfocinas; vida media de las linfocinas, la condición del sistema inmune en el pollito al día de edad o la interacción entre estos factores.

INTRODUCCIÓN

Coccidiosis aviar.

Es una enfermedad provocada por un parásito protozoario del género *Eimeria* que afecta el tracto intestinal, lo que origina un retardo en el desarrollo, baja en la producción, pérdida de peso y una mortalidad variable que depende del grado de parasitosis (McDougal y Reid, 1991; Lillehoj, 1993). Actualmente es la enfermedad parasitaria más importante y que mayores pérdidas económicas causa en las explotaciones avícolas comerciales y rústicas. Afecta principalmente a pollos jóvenes entre la 3a. y 6a. semana de edad. De las especies de *Eimerias* que afectan a los pollos que pueden identificarse con mayor frecuencia en México son: *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. brunetti* (Moreno 1992). De estas especies, las que se localizan e invaden la parte anterior y media del intestino delgado producen una alteración en las funciones de absorción de nutrientes y carotenos por el tracto intestinal, debido principalmente a la destrucción de células intestinales. Esta alteración ocasiona una baja de peso y despigmentación. Dentro de las especies que afectan al intestino grueso están: *Eimeria tenella*, *E. brunetti* y *E. necatrix*. La coccidiosis por *E. tenella*, es la enfermedad más grave debido a la alta mortalidad, pérdida en la ganancia de peso y una evidente melena provocada por el daño hecho por los esquizontes de 2a. generación al invadir las células subepiteliales de las criptas (McDougal y Reid, 1991.; Moreno, 1992).

Control de la coccidiosis aviar.

Para el control de la coccidiosis en pollos, se abarcan aspectos de quimioterapia, inmunoprofilaxis y nutricionales (Arakawa 1993). El uso de drogas anticoccidianas son la principal arma para el control de los brotes de coccidiosis en el mundo. Los anticoccidianos de síntesis química y fermentación biológica, tienen el inconveniente de tener un margen de seguridad muy estrecho debido a la toxicidad y efectos colaterales en el huésped, ocasionados por sobredosis, o como un resultado de manejo, genética, nutrición u otras interacciones.

La limitante más importante del uso de los anticoccidianos, es el desarrollo de resistencia a los fármacos por parte de las coccidias después de la exposición a la medicación, y no menos importante son sus efectos potencialmente tóxicos y la acumulación de sus residuos en los tejidos (Arakawa 1993; McDougal y Reid 1991; McDougal 1994; Moreno 1991).

Inmunoprofilaxis: vacunación vs coccidiosis.

El pollo es el único huésped natural de las coccidias aviares siendo susceptibles a partir del primer día de edad en adelante; sin embargo, se desarrolla inmunidad después de varias exposiciones al parásito (Long, 1986. Nakai, 1992. Bafundo, 1994). A pesar de ello no hay estimulación de inmunidad cruzada entre las especies de coccidias; por lo que es posible encontrar varios brotes en la misma parvada involucrando a veces a más de una especie de coccidia (McDougal and Reid, 1991).

Las vacunas actuales utilizadas en pollos de engorda generalmente no contienen todas las especies de coccidias, solamente contienen las especies que tienen una significativa importancia en la producción de pollo de engorda. Las especies más comunes de coccidias aviares que las vacunas contienen, son: *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*. Estas vacunas vivas se aplican en el agua de bebida o por aspersión en el alimento pocas horas antes de llegar el pollito a la caseta; por lo general las especies presentes en la vacuna serán aparentes aproximadamente 28 días después de la administración de la vacuna (Bafundo, 1994. Moreno 1991). Frecuentemente, las infecciones por *Eimeria tenella* se vuelven más severas durante este intervalo y es posible que la mortalidad alcance niveles no aceptables (Bafundo, 1994).

El éxito de la vacuna en el pollo de engorda depende de que se desarrolle un sistema inmuno competente, por lo que cualquier factor que ejerza un efecto negativo sobre el sistema inmune afectará adversamente la respuesta producida por la vacuna (Bafundo, 1994).

El uso de vacunas contra la coccidiosis tiene un éxito limitado en el pollo de engorda debido a que cuando se considera el uso de vacunas con oocitos vivos, debe evaluarse el impacto económico, ya que incluso las ligeras infecciones con algunas

especies de coccidias afectan la ganancia de peso, conversión alimenticia y pigmentación de la piel (McDougal y Reid, 1991; Bafundo, 1994).

Mecanismos de inmunidad vs coccidiosis aviar.

En el caso de las enfermedades causadas por protozoarios, sobre todo en las producidas por coccidias, los mecanismos de inmunidad no están claros todavía (Tizard, 1989.), pero los trabajos ya se han iniciado para conocer el funcionamiento (García, 1995a). Actualmente se conoce que en el desarrollo de la inmunidad, la respuesta celular juega el papel más importante para el control de las enfermedades intracelulares, donde las células T son fundamentales para el control de la multiplicación del parásito (Roitt, 1993).

En el caso de la coccidiosis aviar está involucrado un conjunto complejo de poblaciones celulares y citocinas en el desarrollo de una inmunidad protectora. Las células T cooperadoras ($T CD4^+$) parecen ser la primer población celular involucrada durante la respuesta inmune. Estas células T cooperadoras promueven: la diferenciación de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, la inducción de la actividad supresora y citotóxica por otras células T; el incremento de actividad de las células NK; la activación de macrófagos y el desarrollo de mastocitos. Las células $T CD8^+$ pueden ser activadas por las células $T CD4^+$, desarrollando funciones supresoras y citotóxicas; de este modo el huésped infectado con coccidia puede incrementar una respuesta a la infección parasitaria (Lillehoj y Trout, 1993). Otro tipo de población celular que interviene en los mecanismos de inmunidad son los macrófagos, cuya función no es tan sólo fagocitando y destruyendo antígenos; ellos participan en la iniciación de una respuesta inmune específica por el procesamiento del antígeno y presentándolo sobre su superficie en asociación con la proteína del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) a los linfocitos. Los macrófagos también pueden secretar componentes citotóxicos, así como citocinas que estimulen a otras células inmunes. Estos macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad pero requieren de activación previa por exposición a citocinas o al parásito (Lillehoj y Trout, 1993).

Citocinas.

El desarrollo de una respuesta inmune específica implica complejas interacciones entre las células linfoides e inflamatorias. Dichas interacciones están mediadas por proteínas solubles de bajo peso molecular, conocidas colectivamente con el nombre de citocinas (Kogut 1996).

Estas citocinas son productos solubles secretados por células inmunes. Son mediadores peptídicos que funcionan como reguladores de incremento y disminución de la respuesta inmunológica, inflamatoria y reparadora de lesión. Estas citocinas son proteínas (generalmente glicoproteínas) de un peso molecular relativamente bajo (de 8 a 25 KDa). Funcionan como señales intercelulares que regulan las respuestas inflamatorias locales y en ocasiones sistémicas. Generalmente no están presentes en el suero y habitualmente actúan parácrinamente o autócrinamente (Sharma, 1991; Roitt, 1993; Openheim, 1993; Kogut, 1996).

Redes de citocinas.

La idea de las redes de citocinas (en inglés: "cytokine networks") se ha desarrollado a través de investigaciones sobre las interacciones que existen entre las poblaciones de células inmunes y no inmunes. Las evidencias, cada vez más abundantes, han demostrado la complejidad de esta cascada de citocinas. Sin embargo, estas interrelaciones funcionales entre citocinas se pueden describir, básicamente, como la respuesta directa de una población de células (células primarias) a estímulos específicos mediante la producción de una citocina particular para ejercer efectos distintos sobre otra población de células (células blanco, o células objetivo {en inglés: target cells}). Las células blanco responden mediante la producción de citocinas que sirven ya sea como señales de retroalimentación para las células primarias, o bien para iniciar una cascada de eventos, afectando a una serie nueva y distinta de células blanco (Kogut 1996).

El papel funcional de las citocinas y de sus interrelaciones funcionales, es crítico para la defensa del huésped y se puede clasificar en tres categorías de la respuesta inmune del huésped:

1.-) *activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos*, lo cual ocurre en respuesta al reconocimiento de un antígeno específico por los linfocitos T.

2.-) *hematopoyesis*, la cual estimula el crecimiento y la diferenciación de las células blastos de la médula ósea, para transformarse en leucocitos maduros.

3.-) *inflamación*, que está involucrada en la movilización de los leucocitos hacia los sitios de la infección o de la lesión tisular.

En el pollo se sabe que ocurren estas tres categorías de la respuesta inmune, aún cuando los mecanismos operativos básicos mediadores de ellas, todavía no están claros (Kogut 1996).

El papel de las citocinas en la respuesta inflamatoria.

La premisa mayor de la inflamación es el reclutamiento de las células efectoras, como son los monocitos y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los sitios de infección o lesión tisular. Los polimorfonucleares son las células inflamatorias que predominan inicialmente en los sitios de reclutamiento para llevar a cabo la inflamación (Kogut 1996).

La extravasación y el secuestro de células polimorfonucleares en el sitio de la inflamación, dependen de una compleja serie de eventos:

1).- La generación local controlada de las citocinas de la respuesta temprana, como por ejemplo el factor de necrosis de los tumores (TNF, por sus siglas en inglés) y la interleucina-1 (IL-1), que conducen a la activación de las células endoteliales y a la expresión superficial de las moléculas de adhesión de los polimorfonucleares, derivadas de las células endoteliales; como por ejemplo las selectinas E y P y la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1, por sus siglas en inglés). Estas moléculas de adhesión son receptores generados por las membranas lumenales de las células endoteliales que recubren internamente a los vasos sanguíneos.

2).- Producción local de citocinas quimiotácticas para activar los polimorfonucleares (como por ejemplo la interleucina-8 [IL-8]).

3).- La activación de los polimorfonucleares y la expresión de las moléculas de adhesión derivadas de éstos, en la sangre periférica; por ejemplo: el CD11b/CD18, ligante para el ICAM-1, y la selectina-L, ligante para las selectinas E y P.

4).- Adherencia de las células polimorfonucleares y de las células endoteliales a través de los ligantes respectivos.

5).- Diapedesis y migración de polimorfonucleares a través de la barrera de células endoteliales al sitio inflamado a través de gradientes quimiotácticos en el tejido local.

Después de haber llegado al sitio inflamado, los polimorfonucleares activados pueden responder a los estímulos mediante fagocitosis y muerte, y mediante la liberación de citocinas adicionales. A medida que continúa el proceso inflamatorio agudo, después de esta etapa de iniciación, la evocación de la memoria de los leucocitos se torna dinámica con la composición celular del infiltrado inflamatorio, cambiando a una población celular en la que predominan las células mononucleares (Kogut 1996).

Utilización de las citocinas.

En la medicina veterinaria existen muchas situaciones en las que puede ser deseable aumentar la capacidad del animal para desarrollar una respuesta inmune. Entre ellas encontramos al aumento de la protección y al tratamiento de enfermedades inmunosupresoras. Muchos y muy diversos son los compuestos que se han utilizado para modificar las funciones del aparato inmunocompetente en los animales domésticos. La clasificación más simple consiste en dividirlos en inmunomoduladores intrínsecos, o sea aquellas moléculas, como las citocinas, que son componentes normales del aparato inmunocompetente; e inmunomoduladores extrínsecos, refiriéndonos a los compuestos externos capaces de modular la función inmune (Tizard 1996).

Los inmunomoduladores intrínsecos son componentes normales de la respuesta inmune. Al administrar citocinas adicionales, se asume que la disponibilidad de estas moléculas en el animal normal es limitante de acuerdo a su cantidad, y que la administración de más citocinas en forma pura, de alguna manera promoverá la resistencia contra la enfermedad, o incluso la curación (Tizard 1996).

Citocinas producidas por los linfocitos T.

Las citocinas producidas por los linfocitos se denominan linfocinas, mientras que los péptidos producidos por monocitos y macrófagos se denominan monocinas (Oppenheim, 1993).

Recientes investigaciones han mostrado la presencia de algunas linfocinas en el sobrenadante de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina A (Con A) como: Interleucina 2 (IL-2) e Interferón gama (INF γ) (Gómez, 1995) y posiblemente Factor necrosante de tumores (TNF) (García, 1995). Estas citocinas secretadas en respuesta a un estímulo tal como Con. A, aloantígenos o por un antígeno específico, son importantes mediadores de la respuesta celular. En investigaciones realizadas con pollos, se ha mostrado que la administración de estos productos solubles de Linfocitas T estimulados con Con A (Linfocinas) y que provienen de aves hiperinmunizadas con antígenos específicos, son capaces de inducir protección ante infecciones por agentes intracelulares como es el caso de *Salmonella enteritidis* (McGruder *et al*, 1993; Téllez *et al*, 1993) y *Eimeria tenella* (Kogut and Slajchert, 1992; García, 1995).

Se ha visto que la administración de estas linfocinas de linfocitos T provenientes de pollos inmunizados contra *E. tenella* (ET-ILK), pueden inducir una importante protección contra una infección por *E. tenella* a los catorce días de edad. El efecto de estas linfocinas se refleja en el incremento de la resistencia del huésped a la infección por este parásito; ya que se observa una significativa reducción en el grado de lesión cecal, así como en la producción de ooquistes (Kogut, 1992; García, 1995). Sin embargo esta protección depende de la vía de administración, ya que se ha mostrado que aves inoculadas intraperitonealmente presentan tal protección, no así las aves inoculadas intramuscular y subcutáneamente (Kogut and Slajchert, 1992).

García (1995) mostró que la administración intraperitoneal de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *E. tenella* y estimulados con Con A, confieren protección ante desafíos con bajos números de ooquistes esporulados de *E. tenella* por un tiempo máximo de cinco días. No obstante, esta administración intraperitoneal de linfocinas a pollos criados comercialmente no sería práctico.

Administración *in ovo* de linfocinas.

Alternativamente, la administración *in ovo* de linfocinas puede ser una solución práctica (McGruder *et al*, 1995). Investigaciones con otras enfermedades han mostrado que la administración *in ovo* de vacunas del virus de Bronquitis infecciosa (Wakenell y

Sharma, 1986); vacunación *in ovo* con virus vivo modificado de la enfermedad de Newcastle (Ahmad and Sharma, 1992); vacunación *in ovo* con Herpes virus del pavo para proteger contra la enfermedad de Marek (Sharma and Burmester, 1982) y la administración de vacunas de baja virulencia contra la enfermedad de Gumboro *in ovo* (Sharma, 1985), pueden proteger a los pollitos contra estas enfermedades sin afectar su incubabilidad o su sobrevivencia.

La administración *in ovo* de linfocinas ha mostrado que confiere protección contra la infección e invasión a órganos por *Salmonella enteritidis* (McGruder, 1995) y *Salmonella gallinarum* (Wong, 1996). Esta vía de administración de linfocinas no compromete la sobrevivencia de los embriones ni la viabilidad de los pollitos al nacer (McGruder, 1995; Wong, 1996). Por estas razones se espera que al administrar linfocinas provenientes de aves inmunes vs *Eimeria tenella* (ET-ILK) *in ovo*, los pollitos nacidos adquieran protección ante una infección temprana por el parásito.

HIPÓTESIS

Las linfocinas provenientes de Linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella* inoculadas *in ovo* al día 18 de la embriogénesis, protegerán a las aves contra un desafío por *E. tenella* al día de edad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la protección conferida por las linfocinas provenientes de Linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella* (ET-ILK) inoculadas *in ovo* al día 18 de la embriogénesis, ante un desafío por *E. tenella* a pollitos de un día de edad.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la disminución de la severidad de lesiones macroscópicas al cuarto día post-desafío, en pollitos inoculados con ET-ILK al día 18 de la embriogénesis y desafiados al primer día de edad con *E. tenella*.

Evaluar la disminución de la producción de ooquistes al sexto día post-desafío, en pollitos inoculados con ET-ILK al día 18 de la embriogénesis y desafiados al primer día de edad con *E. tenella*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de la cepa de *E. tenella* para desafío.

Se utilizó la cepa MOR-80 de *Eimeria tenella*, del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como lo describen Long *et al.*, 1976.

Animales de experimentación.

Se usaron 390 huevos fértiles de reproductoras pesadas Peterson x Aviam Farm, que fueron sometidos a incubación en una incubadora comercial. Después del nacimiento, los pollitos fueron trasladados y alojados en baterías con calefacción que se encuentran en las unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas aves recibieron alimento *ad libitum* con 22% de PC y 2,900 Kcal de energía metabolizable, sin anticoccidiano y agua *ad libitum*.

Animales para inmunización para la obtención de linfocinas (ET-ILK).

Se utilizaron pollos comerciales clínicamente sanos Aviam Farm de 4 semanas de edad, que fueron criados desde el día de edad en baterías con calefacción, agua y alimento sin anticoccidiano *ad libitum* (19% P.C. y 3,100 Kcal de EM). Las aves fueron expuestas al parásito *Eimeria tenella* durante 14 días con una dosis de 1,000 ooquistes/día/ave, que induce una inmunidad sólida en los pollos (Joyner and Norton, 1979). Después de 10 días de la última dosis, las aves fueron sacrificadas para la obtención de los bazo (Kogut, 1992).

Preparación de la suspensión de células esplénicas.

Para la obtención de los esplenocitos, diez días después del proceso de inmunización, se colectaron asepticamente los bazo de estas aves inmunizadas. Los bazo

se pasaron a través de un tamiz de acero inoxidable para tejidos del número 50; utilizando medio para cultivo celular RPMI 1640 adicionado con 100 u/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (P-E). Las células esplénicas fueron centrifugadas a 250 xg por 10 min. a 4 °C. Del paquete centrifugado, solamente se tomó la porción superficial de este botón. Se realizó una sola suspensión de células separadas ($5 - 7 \times 10^6$ células/ml) en medio RPMI 1640, libre de suero y suplementado con L-glutamina, piruvato de sodio y P-E (Kogut, 1992).

Aislamiento de Linfocitos T.

Para purificar los linfocitos T del total de la población de esplenocitos, la suspensión de células aisladas preparadas anteriormente, fueron incubadas en cajas de Petri de vidrio (100x15 mm) por 2 horas a 41 °C en una incubadora con 5 % de CO₂, para separar las células adherentes al vidrio (macrófagos, eritrocitos, trombocitos) de los linfocitos. Las células que no se adherieron al vidrio (Linfocitos T y B), fueron pasadas a través de columnas de Nylon-algodón. Las columnas fueron preparadas por empaquetamiento del Nylon-algodón sin compactarlo a razón de 3.5 gr. en jeringas de 35 ml y esterilizadas por autoclave. Estas columnas fueron preincubadas con RPMI 1640 tibio con 10 % de suero fetal bovino a 41 °C en una estufa con 5 % de CO₂. Los linfocitos fueron aplicados a las columnas en 10 ml. de RPMI que contiene 10% de suero fetal bovino. Estas columnas fueron entonces incubadas por una hora a 41 °C con 5 % de CO₂.

Las células que no se adherieron al Nylon -algodón fueron sastraidas de la columna con medio RPMI tibio. La viabilidad de las células obtenidas fué determinada por tinción de Tripan-azul al 0,1% y la densidad celular fué ajustada para la concentración deseada: 1×10^7 células/ml (Kogut, 1992).

Preparación de linfocinas.

Las linfocinas fueron preparadas por incubación de la suspensión de células que no se adherieron al vidrio ni al nylon-algodón (1×10^7 células/ml) en medio RPMI 1640 que

contiene 7.5 µg/ml de concanavalina A en botellas de cultivo celular de 75 cm² durante 48 horas a 41 °C en una incubadora con 5 % de CO₂.

Después de las 48 horas de incubación, el sobrenadante se colectó y centrifugó a 2,000 x g por 15 min para separar todas las células; se le adicionó methyl α-mannopyranosida (40 µg/ml), para inactivar los residuos de concanavalina A. Se concentraron los sobrenadantes de 10 a 12 veces mediante ultrafiltración, empleando membranas YM-10 (10 Kilodaltons). El material retenido se pasó a través de un filtro (0.45 µm). El producto filtrado fue conservado a -20 °C hasta que fuera utilizado (Kogut, 1992).

Administración de linfocinas.

La administración *in ovo* de las linfocinas se realizó según el procedimiento originalmente descrito por Sharma y Burmester (1982) y modificada por McGruder (1995).

Se inocularon 0.2 ml. a cada embrión de linfocinas inmunes a *E. tenella* (ET-ILK) en cavidad amniótica al día 18 de la embriogénesis.

Desafío con la cepa MOR-80 de *E. tenella*.

Experimento 1. Evaluación de la severidad de lesión cecal. Cuatro días después de la inoculación *in ovo* de ET-ILK, cuando los pollitos contaban con un día de edad, se desafiaron con una dosis de 30,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

Experimento 2 : Recuperación y conteo de ooquistes. Cuatro días después de la inoculación *in ovo* de ET-ILK, cuando los pollitos contaban con un día de edad, se desafiaron con una dosis de 500 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

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

La severidad de las lesiones cecales fue evaluada al cuarto día post-desafío como lo describen Johnson y Reid (1970). El conteo de ooquistes se realizó al sexto día post-desafío tal como lo describe en su técnica Long (1976).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Estudio 1: Se evaluó en el pollito la severidad de lesión cecal macroscópica al cuarto día posterior al desafío con *Eimeria tenella*. Este diseño experimental estuvo formado de la siguiente manera:

No. DE OOQUISTES ESPORULADOS		
GRUPO	PARA EL DESAFIO AL 1er. DIA	No. POLLLOS
A	+	30,000
B	ET-ILK	30,000
C	RPMI	30,000
D	---	NO

- Donde:
- A) + : Grupo testigo de la cepa de *Eimeria tenella*.
 - B) ET-ILK: Grupo experimental inoculado *in ovo* con Linfocinas de aves inmunes a *Eimeria tenella* y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.
 - C) RPMI: Grupo testigo inoculado *in ovo* solamente con el medio de cultivo RPMI 1640 y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.
 - D) Grupo testigo sin inocular y sin desafiar.

Para cada grupo se asignaron aleatoriamente 15 aves con tres réplicas para cada uno.

Estudio 2: Se evaluó el número de ooquistes cecales al sexto día posterior al desafío con *Eimeria tenella* en todos los grupos. Este diseño experimental estuvo formado de la siguiente manera:

No. DE OOQUISTES ESPORULADOS			
GRUPO		PARA EL DESAFIO AL 1er. DIA	No. POLLOS
A	+	500	30
B	ET-ILK	500	30
C	RPMI	500	30
D	-	NO	30

- Donde:
- A) + : Grupo testigo de la cepa de *Eimeria tenella*.
 - B) ET-ILK: Grupo experimental inoculado *in ovo* con Linfocinas de aves inmunes a *Eimeria tenella* y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.
 - C) RPMI: Grupo control inoculado solamente con el medio de cultivo RPMI 1640 y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.
 - D) Grupo control sin inocular y sin desafiar.

Para cada grupo se asignaron aleatoriamente 10 aves con tres réplicas para cada uno.

Análisis estadístico.

Los resultados del conteo de ooquistes fueron sometidos a un ANDEVA para determinar las diferencias entre los tratamientos. Se realizó la prueba de Scheffe para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre medias mediante la utilización del paquete estadístico SAS. Para determinar las diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de las aves con o sin lesiones cecales se utilizó la prueba de Ji cuadrada (Zar, 1984).

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LAS LESIONES MACROSCÓPICAS AL CUARTO DIA POST-DESAFIO (CUADRO 1 Y ANEXO)

Grupo testigo positivo: Aves desafiadas con 30,000 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*, se observaron algunas petequias aisladas en la pared del ciego que corresponde a las lesiones de grado 1+ en 12 de 45 pollitos.

Grupo experimental: inoculado con ET-ILK *in ovo* y desafiado con 30,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el testigo positivo y el grupo experimental ($P > 0.05$).

Grupo testigo inoculado *in ovo* solo con RPMI y desafiado con 30,000 ooquistes esporulados. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el grupo testigo positivo y el grupo inoculado *in ovo* con RPMI ($P > 0.05$). Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo inoculado con ET-ILK y el grupo inoculado *in ovo* con RPMI ($P > 0.05$).

Grupo testigo negativo: No se encontraron lesiones en ninguno de los ciegos de las aves.

EVALUACIÓN DEL NÚMERO DE OOQUISTES RECUPERADOS AL SEXTO DIA POST-DESAFIO (CUADRO 2)

Grupo testigo positivo: Aves desafiadas con 500 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*. Sí se recuperaron ooquistes de los ciegos de las aves. Se contaron 3,500 ooquistes por ml, promedio del macerado de los ciegos de las 10 aves de cada réplica.

Grupo experimental: inoculado con ET-ILK *in ovo* y desafiado con 500 ooquistes esporulados de *E. tenella*. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el testigo positivo y el grupo experimental ($P > 0.05$).

Grupo testigo inoculado *in ovo* solo con RPMI y desafiado con 500 ooquistes esporulados. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el grupo testigo

positivo y el grupo inoculado *in ovo* con RPMI ($P > 0.05$). Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo inoculado con ET-II.K y el grupo inoculado *in ovo* con RPMI ($P > 0.05$).

Grupo testigo negativo: No se recuperaron ooquistes en ninguna de las réplicas.

DISCUSIÓN

En la coccidiosis aviar el efecto profiláctico mediante la administración del solrenadante de linfocitos T estimulados con concanavalina A (linfocinas), provenientes de aves inmunes contra *Eimeria tenella* (ET-ILK), es dependiente de la ruta de administración (Kogut 1992). Recientes investigaciones han mostrado que la administración intraperitoneal de linfocinas provenientes de aves inmunes a *Eimeria tenella* (ET-ILK) y linfocinas provenientes de aves inmunes a *Salmonella enteritidis* (SE-ILK), confieren protección contra desafíos por estos respectivos agentes (Kogut 1992; McGruder 1993; Téllez *et al* 1993). En el caso de la administración intraperitoneal de SE-ILK se ha visto que también confiere protección contra *Salmonella gallinarum* (Wong 1993; Wong 1996) y contra *Eimeria tenella* (García 1995b). Esto sugiere que hay una protección inespecífica conferida mediante la administración de linfocinas.

Esta protección se ha asociado con un incremento concomitante de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en sangre periférica (McGruder 1995) y con un importante aumento en el grosor de la lámina propia en ciegos; en donde se observa una marcada infiltración de estas células inflamatorias (Téllez *et al* 1993).

Kogut (1992) reporta que cuando se administran ET-ILK por vía intraperitoneal es provocada una respuesta inflamatoria que es caracterizada por una migración de células fagocíticas y linfoides a la cavidad peritoneal. Esta respuesta inflamatoria resulta en la inducción de un gran número de macrófagos activados, con un incremento de actividades funcionales que incluyen: la habilidad de matar microorganismos y células tumorales; además de regular la inmunidad adquirida mediante la presentación de antígenos al linfocito. El autor supone que es posible que tal macrófago se encuentre presente cerca del lugar donde la coccidia infecta el epitelio intestinal. El macrófago migra al sitio de infección y juega un papel en el incremento de la protección, reduciendo el grado de lesión y la producción de ooquistes.

En el caso de la administración *in ovo* de linfocinas, en el presente trabajo se observó que la administración de ET-ILK al día 18 del desarrollo embrionario, no confiere

protección a pollitos de un día de edad contra un desafío por *Eimeria tenella*. Esta falta de protección puede deberse a la influencia de varios factores, tales como: la vía de administración de las linfocinas, cantidad de estas linfocinas, vida media de las mismas o la condición del sistema inmune del pollito a esa edad.

Vía de administración de las linfocinas: McGruder (1995) mostró que la administración de SE-ILK al día 18 de la embriogénesis confieren protección a pollitos de un día de edad contra la infección e invasión a órganos por *S. enteritidis* al nacimiento. Wong (1996) reporta que esta administración *in ovo* de SE-ILK presenta un efecto protector en mortalidad e invasión a órganos durante 5 días post-desafío con *S. gallinarum*.

En el presente trabajo se inocularon las linfocinas en la cavidad amniótica (McGruder 1995). El amnios es un saco que está lleno de un líquido transparente que le sirve al embrión para flotar y protegerlo de posibles traumas (North 1993; Parkhurst 1988). Al día 18 del desarrollo embrionario el pollito está acomodado con la cabeza de tal manera que el pico se encuentra por debajo del ala derecha y hacia la parte inferior de la amplia cámara de aire (North 1993). A este tiempo el líquido amniótico casi ha desaparecido (Parkhurst 1988), ya que una importante cantidad de este líquido amniótico es ingerido entre el día 17 y 18 (Watkins 1995). Esto hace suponer que al momento de ser inoculadas las linfocinas, la cantidad de líquido amniótico es mínima y no todo el inóculo es ingerido por el embrión, ya que al momento de nacer el pollito se encuentra bañado por el amnios.

Cantidad de linfocinas: Aún cuando el pollito lograra ingerir la cantidad inoculada de linfocinas (0.2 ml), no se tiene la información de la cantidad exacta de estas linfocinas contenidas en el inóculo. Investigaciones anteriores que han utilizado linfocinas, las definen como factores secretados por los linfocitos T bajo la activación de un mitógeno o un antígeno específico (Kogut 1992; McGruder 1993; Téllez 1993). Recientemente se han identificado las linfocinas IL-2, IFN γ (Gómez 1995), en los sobrenadantes de linfocitos T estimulados con Con. A, de aves inmunes vs *S. enteritidis* (SE-ILK) y *S. gallinarum* (SG-ILK) y posiblemente TNF en los sobrenadantes de ET-ILK (García 1995a). A pesar de que

se han identificado estas linfocinas aviares, aun no se ha cuantificado su concentración en este sobrenadante. Tal vez la cantidad de linfocinas inoculadas no sea la suficiente para estimular una respuesta inmune en el pollito que lo proteja contra una infección por *E. Tenella*.

Vida media de las linfocinas: García (1995 a) mostró que las linfocinas inoculadas i.p., confieren protección a pollos de 2 semanas de edad contra un desafío por *E. Tenella*. Esta protección se observó hasta el 5^o día post-inoculación, ya que los animales desafiados después de este tiempo, fueron susceptibles a la coccidiosis. En el ciclo de vida normal de la coocidia, cuando es ingerido el ooquiste esporulado, tarda un día para que se liberen los esporozoitos e infecten a la célula. Para el segundo día post-infección se forman los esquizontes de 1^a generación y al tercer día post-infección se liberan los merozoitos de la 1^a generación. Este es el momento a partir del cual la inmunidad debe de estar presente para evitar que sean infectadas otras células (McDougal y Reid, 1991). En el presente estudio, del momento en que se inocularon las linfocinas a el momento en que se desafío el pollito, transcurrieron 4 días. Para cuando el parásito se encuentra en su fase de merozoito, ya han transcurrido 7 días desde que se inocularon las linfocinas, y según las observaciones hechas por García (1995a) las linfocinas no protegen al 100% a este tiempo. Tal vez es por esta razón que al inocular las linfocinas, estas posiblemente sufrieran una desnaturalización antes de encontrar una célula blanco para desencadenar la cascada de eventos involucrados en una respuesta celular.

Sistema inmune del pollito: Durante el desarrollo embrionario se han detectado los primeros leucocitos al día seis en el saco vitelino. Se han encontrado macrófagos en bazo y en saco vitelino al noveno día; en intestino, bolsa de Fabricio y timo al décimo día; y en hígado al día 12 (Jansen *et al* 1991). Los niveles de heterófilos encontrados en embrión de pavo son entre 80 y 90 % y los basófilos, eosinófilos y monocitos constituyen menos del 10% (Allsep *et al* 1990). En el embrión de pollo se sabe que los linfocitos aparecen en el timo alrededor del día 11 del desarrollo embrionario. Aquí el timo proporciona el

microambiente necesario para la diferenciación de la célula madre en subpoblaciones distintas de linfocitos: linfocito T CD4⁺ y linfocito T CD8⁺ (Glick 1988).

Lowenthal (1994) encontró que las células T de pollitos de un día de edad, son fenotípicamente maduras y capaces de ligar mitógenos tal como lo hacen las células T de aves maduras. Sin embargo, estas células fueron funcionalmente inmaduras debido a su incapacidad para proliferar o producir citocinas seguido a un estímulo inmune. Este investigador explica que las células presentes en el bazo de pollitos de un día de edad, seguramente producen un inhibidor soluble que evita la proliferación de células T. El mismo autor observó que la producción de este inhibidor decrece dramáticamente por el segundo día de nacimiento, el cual coincide con un incremento en la habilidad de las células T para responder a una estimulación inmune. Estos resultados sugieren que el período en el cual las células T no responden a la inestimulación, es mediada por una inmadurez funcional de las células T y la producción de un inhibidor soluble.

Esta información coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. La ausencia de protección mediante la administración *in ovo* de las ET-H.K, puede ser ocasionada por la inmadurez de las células T del pollito al primer día de edad.

Adicionalmente, esta falta de protección puede deberse a los factores antes mencionados o a la interacción entre éstos.

CONCLUSIONES

La inoculación *in ovo* de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *Eimeria tenella* (ET-ILK), no confieren protección ante un desafío con este parásito en pollitos de un día de edad.

En el caso de la protección conferida mediante la administración *in ovo* de linfocinas provenientes de aves inmunes a *Salmonella enteritidis* (SE-ILK), contra la infección e invasión a órganos por *S. enteritidis* y *S. gallinarum*, sugiere que las células blanco de las SE-ILK involucradas en la protección, posiblemente sean diferentes a las células involucradas contra *E. tenella* en pollitos de un día de edad.

LITERATURA CITADA

- Ahmand, J. and Sharma, J.M.: Evaluation of a modified-live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. Am. J. Vet. Res. 53: 1999 - 2004 (1992).
- Allsep, T.; Wiggins, M. And Birrenkoft, G.: Normal growth and white blood cell development in large white turkey embryos. Poultry Sci. 69: 2027 - 2034. (1990).
- Arakawa, A. and Xie, M.Q.: Control of Coccidiosis in chickens. J. Protozol. Res.: 3 : 31-39 (1993).
- Bifundo, K.W.: Aplicación práctica con vacunas de oocistas vivos en la avicultura comercial. Memorias del VIII seminario Internacional de patología aviar. Universidad de Athens Georgia y AMEVFA: 285-296. (1994).
- García, E.G.: Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1995 a).
- García, E.G.; Téllez, I.G.; Casaubon, H.M.; Moreno, D.R.; Kogut, M.H. y Hargis, B.M.: Evaluación de la protección conferida por linfocinas 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: 100 - 105. México D.F. (1995 b).
- Glick, Bruce: Immunophysiology. In Avian Physiology. Edited by Sturkey. In press. Acad. Press. 1988.
- Gómez, V.G.: Identificación de linfocinas en sobrenadantes de esplenocitos de pollo estimulados con Concanavalina A. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1995.
- Jansen, E.M. and Jeurissen, S.H.M.: Ontogeny and function of two nonlymphoid cell population in the chicken embryos. Immunobiology, 182: 472 - 481 (1991).
- Johnson, J. and Reid, W.M.: Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floorpen 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).
- Kogut, M.H. and Slajchert, T.: T-Lymphocytes confer protections in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. Immun. and Inf. Dis. **2**: 69 - 79 (1992).
- Kogut, M.H.; Moyes, R.B. and DeLoach.: Las citocinas y sus interrelaciones funcionales: Potenciación de la respuesta inflamatorias en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en las aves. Memorias: Avances en inmunología aviar. ANIECA. México D.F. (1996).
- Lillehoj, H.S. and Trout, J.M.: Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Path. **22**: 3 - 31. (1993).
- Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P. and Norton, C.C.: A guide to laboratory techniques used in study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Veterinaria Latina **VI**: (3) 201 - 217 (1976).
- Lowenthal, J.W.; Connick, T.E.; McWaters, P.G. and York, J.J.: Development of cell immune responsiveness in the chicken. Immun. and cell biol. **72** : 115 - 1232 (1994)
- McDougal, L.: Testigo de la coccidiosis en el siglo XXI. Memorias del VIII Seminario Internacional de Patología Aviar. Universidad de Athens Georgia y AMEVEA. 275 - 284 (1994).
- McDougal, R.L. and Reid, M.W.: Coccidiosis. In Diseases of Poultry. Edited by Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Berd, C.W.; Reid, M.W. and Yoder Jr., H.W.. 9Th. pp 780 - 787. Iowa State University Press, Ames Iowa, U.S.A. 1991.
- 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 Sci. **74**: 18 - 25 (1995)

- McGruder, E.D.; Ray, P.M.; Tellez, G.I.; Kogut, M.H.; Corrier, D.E.; DeLoach, J.R. and Hargis, B.M.: *Salmonella enteritidis* Immune Leukocyte-Stimulated Soluble Factors: Effects on Increased resistance to *Salmonella* organ invasion in Day-Old Leghorn Chicks. Poultry Sci. 72: 2264 - 2271 (1993).
- Moreno, D.R.: Endoparásitos más frecuentes en las gallinas. Memorias de la III Jornada Médico avícola. 146 - 148. Fac. Med. Vet. y Zoot. de la UNAM, México, D.F. (1992).
- Moreno, D.R.: Vacunación contra la coccidiosis. Memorias de la II Jornada Médico avícola. 203 - 208. Fac. Med. Vet. y Zoot. de la UNAM, México, D.F. (1991).
- Nakai, Y.; Uchida, T. and Kanazawa, K.: Immunization of chickens by trickle infection with *Eimeria tenella*. Avian Dis. 36: 1034 - 1036. (1992).
- North.: Manual de Producción Avícola. 3a. Ed. Edit. EL Manual Moderno. México D.F. 1993.
- Oppenheim, J.J.; Ruscetti F.W. and Faltynek, C.: Citocinas; en Immunología Básica y Clínica. Editado por: Stites, D.P. y Terr, A.I.; 3a. Ed. pags: 85 - 110, Edit. EL Manual Moderno. México, D.F. 1993.
- Parkhurst, C. R. And Mountney, G.J. : Poultry meat and egg production. An avibook. Edited by Library of congress Cataloging. 1988.
- Roitt, Y.; Brustoff, J. And Male, D.: Immunology. Third Ed. Mosby press, Hong-Kong. 1993.
- Sharma, J.M. and Burmester, B.R.: Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. Avian Dis. 26: 134 - 149 (1982).
- Sharma J.M.: Embryo vaccination with infectiuos bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. Avian Dis. 29: 1155-1169 (1985).
- Sharma, J.M.: Overview of the avian immune system. Vet. Immun. And Immunopath. 30: 13 - 17 (1991).
- Tellez, I.G.; Kogut, M.H. and Hargis, M.B.: Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infection by lymphokines in Leghorn Chicks. Avian Dis. 37: 1062 - 1070 (1993).

- Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*. 3a. Ed. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F. 1989.
- Tizard, I.: Uso de Inmunomoduladores en Medicina Veterinaria, con especial énfasis en la inmunomodulación en las aves de corral. Memorias de: Avances en inmunología aviar. ANECA: 57 - 65, México D.F. (1996).
- Wakenell, P.S. and Sharma J.M.: Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res. 47: 933 - 938 (1986).
- Watkins, K.L.; Brooks, M.A. and Jeffers, T.K.: The effect of *in ovo* or sporocyst inoculation on response to subsequent coccidial challenge. Poultry Sci. 74: 1597 - 1602. (1995).
- 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 Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1993.
- Wong, G.R.: Inmunoprofilaxis mediante linfocinas aplicadas *in ovo* y en pollos de engorda contra la infección por *Salmonella gallinarum*. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1996).
- Zar, J.: *Biostatistical analysis*. 2 th. Ed. Prentice-Hall Inc.: 384 - 351. Englewood cliffs. 1984.

Cuadro 1: Evaluación de la disminución de la severidad de lesión cecal al 4º. día post-desafío con *E. tenella* en pollitos de un día de edad inoculados con ET-ILK *in ovo* al día 18 del desarrollo embrionario.

GRUPO**	No. DE OOQUISTES	REPETICION 1		REPETICION 2		REPETICION 3		TOTAL	
		Severidad/lesión*	No. De aves						
+	30,000	1+	5/15	1+	3/15	1+	4/15	1+	12/45
		0	10/15	0	12/15	0	11/15	0	33/45
ET-ILK	30,000	1+	4/14	0	15/15	1+	2/15	1+	6/44
		0	10/14			0	13/15	0	38/44
RPMI	30,000	0	14/14	1+	6/15	1+	3/15	1+	9/44
				0	9/15	0	12/15	0	35/44
-	-	0	15/15	0	15/15	0	14/14	0	44/44

No hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($P > 0.05$).

* La severidad de la lesión está expresado por la escala de Johnson & Reid.

** Donde: +: Grupo testigo de la cepa de *Eimeria tenella*.

ET-ILK: Grupo experimental inoculado *in ovo* con Linfocinas de aves inmunes a *Eimeria tenella* y desafiado con 30,000 ooquistes esporulados de

Eimeria tenella.

RPMI: Grupo control inoculado solamente con el medio de cultivo RPMI 1640 y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.

-: Grupo control sin inocular y sin desafiar.

Cuadro 2: Evaluación de la disminución en el número de ooquistes recuperados 6° día post-desafío con *E. tenella* en pollitos de un día de edad inoculados con ET-ILK *in ovo* al día 18 del desarrollo embrionario.

GRUPO**	DESAFIO/No. OOQUISTES	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	TOTAL
		No. ooquistes recuperados*	No. ooquistes recuperados*	No. ooquistes recuperados*	No. ooquistes recuperados
+	500	No se realizó	1,000/ml	6,000/ml	3,500/ml
ET-ILK	500	1,000/ml	0/ml	2,000/ml	1,000/ml
RPMI	500	5,000/ml	3,000/ml	1,000/ml	3,000/ml
-	-	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($P > 0.05$).

*Se reporta el promedio de ooquistes contados del macerado de los 10 ciegos por cada grupo por ml.

** Donde: + : Grupo testigo de la cepa de *Eimeria tenella*.

ET-ILK: Grupo experimental inoculado *in ovo* con Linfocinas de aves inmunes a *Eimeria tenella* y desafiado con 30.000 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*.

RPMI: Grupo control inoculado solamente con el medio de cultivo RPMI 1640 y desafiado con ooquistes esporulados de *E. tenella*.

- : Grupo control sin inocular y sin desafiar.

ANEXO

VALORES DE LAS LESIONES MACROSCÓPICAS POR LA ESCALA DE JOHNSON & REID EN CADA UNO DE LOS CIEGOS DE LOS POLLITOS DEL EXPERIMENTO

	GRUPO +		GRUPO EXPERIMENTAL ET-ILK		GRUPO INOCULADO SOLO CON RPMI		GRUPO NEGATIVO	
REPLICA 1	1+	0	1+	0	0	0	0	0
	1+	0	1+	0	0	0	0	0
	1+	0	1+	0	0	0	0	0
	1+	0	1+	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 2	1+	0	0	0	1+	0	0	0
	1+	0	0	0	1+	0	0	0
	1+	0	0	0	1+	0	0	0
	0	0	0	0	1+	0	0	0
	0	0	0	0	1+	0	0	0
	0	0	0	0	1+	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 3	1+	0	1+	0	1+	0	0	0
	1+	0	1+	0	1+	0	0	0
	1+	0	0	0	1+	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1+ 12/45		1+ 6/44		1+ 9/44		1+ 0/45	
PORCENTAJE	1+	26.6%	1+	13.6%	1+	20.4%	0	100%
	0	73.4%	0	86.4%	0	79.6%		

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA