

11
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CULTIVO PRIMARIO DE ENTEROCITOS DE POLLO
COMO MODELO DE ESTUDIO EN LA INMUNIDAD
CELULAR CONTRA *Eimeria tenella*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

LILIA CASTELLANOS NOVOA

ASESORES: MVZ., MC. GARY GARCIA ESPINOSA.
MVZ., PhD. TAMAS FEHERVARI.
MVZ., PhD. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS.



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

259013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

DEDICATORIA

A mi Dios, por darme todo lo que tengo,
por estar conmigo, siempre con su amor
que llena todos los huecos del alma.

A mamá, por siempre estar
conmigo en las buenas y en las
malas, por su apoyo y comprensión.

A papá, por su ejemplo, su
fuerza, su tiempo para edu-
carme y tu gran paciencia.

A ambos, les agradezco su amor y sus
sacrificios que han hecho por mí.

A mi hermana Luz, siempre has sido
la persona que más he admirado, con la
que siempre he contado y yo sé que
pase lo que pase siempre estaremos
unidas.

A la UNAM, en especial a la
FMVZ, por la admiración que
le tengo, el estudiar en ella
ha sido un honor, espero no
desepcionar a todos los que
forman parte de ella.

A José Alberto Orduña S. gracias
por tu amor, tu comprensión y
por levantarme el ánimo, cuando
las cosas no salían como lo espe-
raba.

A mi abuelita Luz P. y mi abuelito
David N. porque donde esten, yo
sé que su recuerdo y su amor han ilu-
minado mi vida.

A mi abuelita Luz A. gracias ppor
tus oraciones que siempre me han
protegido y ayudado. A mi abuelito
Alfonso gracias por tu cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gary García gracias por la fé, el apoyo y la confianza que me tuviste al darme este tema de tesis, por abrirme a un mundo de la investigación que desconocía.

Al Dr. Tamas Fehervari gracias por la ayuda incondicional, su apoyo, tiempo y por enseñarme tantas cosas.

Al Dr. Téllez gracias por la confianza, el apoyo, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo, espero no defraudarlo.

A mi jurado muchas gracias por todo el tiempo que le dedicaron a este trabajo, que va mucho más allá de lo que me imaginé.

Mil gracias a Jesús Cabriales por su ayuda, sus enseñanzas, su tiempo, fuiste indispensable para que lograra terminar este trabajo.

Al Dr. Nestor Ledezma M. porque además de ser mi maestro y un gran amigo, nunca alcanzaré a agradecerte el tiempo y la ayuda para terminar este trabajo.

A mi gran amigo Julio César Alfaro C. Nunca olvidaré tu noble amistad, te agradezco todo lo que has hecho por mi, el estar conmigo cuando te he necesitado y tu ayuda para terminar este trabajo.

Muchas gracias a Rosario Ramos por tus enseñanzas y amistad, a mis maestros Dra. Casaubón y al Dr. Quintana.

Al Departamento de Producción Animal: Aves, por ser el lugar donde se me ha permitido desarrollarme, por su apoyo y todo lo que de él he recibido.

Al Departamento de Patología, gracias por su ayuda.

A mis amigos con quienes siempre he contado: Melissa, Lorena, Ma. de Jesús, Elizabeth, Marisol, Laura, Felipa, Mony, Mary Carmen, Angy, Judith, Rosy, José, Oddette, Victor, Marco, Daniel O., Daniel M., Gerardo, Alejandro M., Sr. Rodrigok, Sr. Juanito, Sr. Adelfo y mis amigos de patología.

Gracias a todos los que me ayudaron en este trabajo.

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
RESUMEN	1
I.-INTRODUCCION	2
1.1.- Coccidiosis.	2
1.1.1.- Características de la coccidiosis.	2
1.1.2.- Características de <i>Eimeria tenella</i> .	3
1.1.3.- Ciclo de <i>Eimeria tenella</i> .	3
1.1.4.- Lesiones macroscópicas.	4
1.1.5.- Lesiones microscópicas.	4
1.2.- Inmunología contra coccidias.	5
1.2.1.- Inmunidad innata.	5
1.2.2.- Inmunidad específica.	6
1.3.- Cultivo celular.	8
1.3.1.- Cultivo de células epiteliales.	8
1.3.2.- Ventajas y desventajas del cultivo celular.	8
1.4.- Justificación del trabajo.	9
II.- HIPOTESIS	11
III.- OBJETIVOS	11
3.1.- Objetivo general.	11
3.2.- Objetivos particulares.	11
IV.- MATERIAL Y METODOS	
4.1.- Estrategia general	12
4.2.- Cultivo celular primario de enterocitos de pollo.	13
4.2.1.- Medio de aislamiento.	13
4.2.2.- Medio de incubación.	13
4.2.3.- Solución Salina Fisiológica.	13
4.2.4.- Obtención del cultivo celular.	14
4.2.5.- Obtención de la concentración celular y establecimiento de tiempo de vida.	15

CONTENIDO	PAGINAS
4.2.6.- Verificación del proceso	15
4.3.- Preparación de esporozoitos.	16
4.3.1.- Desinfección de oocistos.	16
4.3.2.- Preparación de los esporozoitos.	16
4.4.- Infección de las células con los esporozoitos.	17
V.- RESULTADOS	19
5.1.- Cultivo celular	19
5.1.1.- Obtención del cultivo celular.	19
5.1.2.- Obtención de la concentración celular y establecimiento del tiempo de vida.	19
5.2.- Infección celular con esporozoitos.	20
5.3.- Verificación del proceso.	21
VI.- DISCUSION	29
VII.- CONCLUSION	33
VIII.- BIBLIOGRAFIA	34

RESUMEN

Lilia Castellanos Novoa. Cultivo primario de enterocitos de pollo como modelo de estudio en la inmunidad celular contra *Eimeria tenella*. Bajo la asesoría de: MVZ, MC. Gary García Espinosa. MVZ, PhD. Tamas Fehervari. MVZ, PhD. Guillermo Téllez Isaías.

En el presente estudio se adaptó un método para obtener un cultivo primario de enterocitos cecales de pollo; dicho cultivo llega a mantenerse hasta 3 o 4 semanas viable, cuando se les cambia el medio de incubación diariamente o cada tercer día. Este cultivo celular fue infectado con esporozoitos de *Eimeria tenella* utilizando una relación de 1 esporozoito por 50 células, con una concentración de 4000 esporozoitos por 1 ml. y 200,000 células por mililitro, incubándolo a 37°C con 4% de CO₂. Se evaluó la infección in vivo en la placa de cultivo celular durante los siguientes siete días. El tiempo óptimo de infección es de 24 a 48 horas tiempo suficiente para que se infecten las células. El cultivo celular fue susceptible a la infección por esporozoitos de *Eimeria tenella*. Se observaron algunas células con citomegalia con estructuras internas y de color más oscuro, así como esporozoitos con bastante movimiento a las 24 horas postinfección. Con éstos resultados se concluye que el cultivo celular de enterocitos de pollo, puede ser utilizado como modelo *in vitro* para estudiar los mecanismos inmunológicos en infecciones intracelulares por *Eimeria tenella*.

I.- INTRODUCCION

1.1.- COCCIDIOSIS

1.1.1.- Características de la coccidiosis

En México, la coccidiosis es el principal problema parasitario y el que mayores pérdidas económicas causa en las explotaciones avícolas comerciales y rústicas. Se caracteriza por retardo en el desarrollo, baja en la producción, pérdida de peso y mortalidad variable que depende del grado de parasitosis presente.^{15,8,13,4}

La coccidiosis se ha definido como una enfermedad del aparato digestivo de las aves producida por protozoarios del género *Eimeria*; del phylum Apicomplexa que son parásitos intracelulares del epitelio intestinal.^{15,8}

Afecta principalmente a aves jóvenes entre la 4a y 6a. semanas de edad. Se han descrito nueve especies de *Eimeria* de pollos, las más frecuentes en México y hasta ahora plenamente identificadas son: *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti* y *E. acervulina*. Existen varias cepas de cada especie con diferente grado de patogenicidad.^{15,13}

Las características principales del género *Eimeria* son:

Las distintas especies tienen marcada especificidad de huésped, especie y predilección para desarrollarse en tejidos específicos. La estructura de los oocistos esporulados contienen siempre cuatro esporocistos, cada uno con dos esporozoitos; Las infecciones por coccidias, dependen en gran parte de la cantidad de los ooquistes ingeridos, y del estado inmune del ave.⁸

1.1.2.- Características de *Eimeria tenella*.

Esta especie se encuentra en la mucosa de los ciegos, lo que origina una grave enfermedad cuyos signos principales son: diarrea sanguinolenta, alta morbilidad y mortalidad, pérdidas en la ganancia de peso y emaciación. Los ooquistes tienen forma ovoide, son anchos, de pared lisa, miden 21.7 por 17.5 micras y tienen gránulo polar.^{15,8}

1.1.3.- Ciclo de *Eimeria tenella*

El ooquiste que es evacuado por las heces, esporula a nivel del suelo y es ingerido por el ave; el ooquiste pierde su pared por acción mecánica de la molleja y de las sales biliares; se liberan los esporozoitos los cuales se adhieren a las células en la mucosa del intestino, y por medio de proteasas penetra la membrana de la célula hospedadora del epitelio, ahí cada esporozoito se redondea, formando el estado de trofozoito, crece y se transforma en esquizonte por un proceso de fisión binaria múltiple asexual (esquizogonia), cada uno de ellos da lugar a 900 merozoitos en la primera generación (dos días y medio postinfección), su esquizonte máximo mide 54 micras, después cada merozoito se adhiere y penetra a una célula del subepitelio; en dichas células subepiteliales o de la lámina propia el merozoito se redondea, crece y forma la segunda generación de esquizontes, donde da origen aproximadamente a 250 merozoitos de segunda generación al quinto día de infección. Algunos merozoitos todavía dan lugar a una tercera generación de esquizontes originando 7 a 30 merozoitos. La mayoría de los merozoitos de la segunda y los de la tercera generación se adhieren a células del subepitelio para iniciar la fase sexual o gametogonia. Los merozoitos se diferencian en microgametos y macrogametos, los microgametos se introducen en las células epiteliales en que se localizan los macrogametos y se realiza la fecundación. Los macrogametos pasan a la periferia y forman parte de la

pared del ooquiste después de la fecundación, la formación de esta pared marca el momento de transición de un macrogameto fecundado a un ooquiste; el cual aumenta de tamaño, se rompe, alcanza el lumen cecal y sale con las heces. El período prepatente dura siete días. Los oocistos no son infectivos hasta que ha tenido lugar la esporulación que toma de 1 a 2 días bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad en el piso.^{8,13,18,16.}

1.1.4.- Lesiones macroscópicas:

Durante la maduración de los esquizontes de primera generación, se pueden ver pequeños focos del epitelio desnudo. La mucosa se puede observar blanquizca. En el cuarto día postinfección, la segunda generación de los esquizontes están maduros y se pueden observar hemorragias de diferentes grados, los ciegos se ven muy agrandados y distendidos con coágulos de sangre y porciones de mucosa cecal en la luz. La infección puede verse desde la superficie serosa de los ciegos como hemorragias petequiales que llegan a unirse en infecciones más severas. En casos crónicos se puede presentar exudado caseoso. La pared de los ciegos frecuentemente está muy engrosada debido al edema e infiltración, posteriormente se presenta tejido cicatrizante.^{14,19}

1.1.5.- Lesiones microscópicas:

Al estudio histopatológico se observa una amplia diseminación de esquizontes de primera generación y pequeñas hemorragias y áreas de necrosis cerca de los vasos sanguíneos de las fibras internas de la capa muscular. La infiltración de heterófilos de la submucosa procede con rapidez conforme se desarrollan los esquizontes de la segunda generación en la lámina propia. La maduración de los parásitos de segunda generación se acompaña de grave daño tisular, hemorragias, ruptura de las glándulas cecales y muchas veces destrucción completa de la mucosa y de la capa muscular, observándose oocistos, macrogametos y microgametos móviles al 6° y 7° día. La regeneración del epitelio y las glándulas puede completarse al décimo día en las infecciones leves, pero el epitelio nunca

se llega a recuperar por completo en infecciones graves, la mucosa muscularis perdida no se reemplaza y la submucosa se vuelve densamente fibrosa.^{15,13}

1.2.- INMUNOLOGIA CONTRA COCCIDIAS:

Cada etapa de el ciclo de las *Eimerias* tiene diferente material antigénico. Durante las fases extracelulares el parásito es susceptible, teóricamente, a la acción de factores que se encuentran en los fluidos de los tejidos, como son los anticuerpos, el complemento, los mediadores de la inflamación y las citocinas, así como a los componentes de la resistencia natural como son la fagocitosis. Cuando el parásito está dentro de las células muchos de éstos factores son ineficaces, y solo puede ser afectado por mecanismos intracelulares como son los radicales de oxígeno, radicales de nitrógeno, enzimas lisosomales y pH en células fagocíticas o la destrucción de la célula hospedadora a través de actividad lítica por células citotóxicas.²³

El organismo se vale de múltiples mecanismos para combatir las infecciones causadas por parásitos como los protozoarios y dentro de éstos mecanismos entran en juego tanto la inmunidad innata como la inmunidad específica.¹

1.2.1.- Inmunidad inata.

La respuesta inmune es iniciada por el reconocimiento del antígeno parasitario en la mucosa, en las placas de Peyer y en los nódulos linfoides.²³

Las acciones de los anticuerpos contra *Eimeria* pueden incluir la opsonización para una subsecuente fagocitosis, participación en la citotoxicidad, lisis a través de la activación de el complemento, prevención de la invasión por la inmovilización de la mucosa y de la superficie epitelial o por la interferencia con el proceso de reconocimiento de la membrana. Todas estas actividades deben ser directamente contra las etapas extracelulares.²³

1.2.2.- Inmunidad específica.

La inmunidad celular ha sido considerada de gran importancia en el desarrollo de resistencia en la coccidiosis intestinal, ya que interfiere con la penetración y multiplicación de las fases intracelulares de las coccidias en las células epiteliales. La destrucción de parásitos por acción de macrófagos y la concentración de linfocitos T en áreas localizadas, tienen lugar en las primeras semanas de la infección y aparece más tempranamente en casos de reinfecciones. La inmunidad celular desencadena las reacciones de hipersensibilidad, evidentes en las infecciones por coccidias de la mucosa intestinal.²⁰

Los linfocitos B secretan IgG localmente y sistémicamente; la IgA que también llega al intestino. Los anticuerpos interactúan para iniciar los cambios inflamatorios, y pueden actuar directamente con el parásito.²³

La IgM es la primera en aparecer en sangre circulante, alcanzando un máximo de concentración para luego decaer rápidamente. La IgG aparece más tardíamente, pero su descenso es más lento; igualmente, se han puesto en evidencia altas concentraciones de IgA en secreciones biliares, lámina propia, mucus intestinal y en particular en el contenido cecal de pollos infectados con *E. tenella* donde parece tener una acción lítica sobre varias formas de parásitos.²⁰

Las células T producen también cambios en las células epiteliales incluyendo a los enterocitos, las células globosas y los linfocitos intraepiteliales.²³

Se ha evidenciado por inmunohistoquímica que existe un aumento considerable de Linfocitos T (LT) con Determinante de Agrupación 8⁺ (CD8⁺) y algunos LTCD4⁺ durante la infección primaria por *Eimeria tenella* en el tejido cecal.²³ Considerando que los LTCD8⁺ reconocen a través del epitopo expresado en el Complejo Mayor de

Histocompatibilidad (MHC) clase I de la célula infectada para posteriormente lisarla. Esto podría sugerir que posiblemente éstos LTCD8⁺ están reconociendo algunos epítomos de *Eimeria tenella* y estarían lisando estas células infectadas. Sin embargo no se sabe que células infectadas presentan éstos epítomos, así como tampoco en que fase del ciclo y más aún no se sabe si éstos LTCD8⁺ realmente estén reconociendo algún epítomo de *Eimeria tenella*.²⁰

Los LTCD4⁺ cooperadores son mediadores de la inmunidad por el inicio de una serie de complejos eventos inflamatorios en el intestino. Las células epiteliales al ser infectadas por el parásito expresan partículas de éste unidas a las moléculas clase I del MHC sobre su superficie, que es reconocido por LTCD8⁺ provocando una respuesta citotóxica. Los LTCD8⁺ parecen inhibir la diseminación de esporozoitos de la célula huésped a los enterocitos y pueden atacar a las células epiteliales infectadas a través de la lisis de las células infectadas.^{23, 11}

Una importante expresión de la actividad antiparasitaria de los linfocitos T es la liberación de linfocinas como el IFN- γ el cual tiene la propiedad de activar los mecanismos de destrucción de las células fagocíticas intestinales. Las linfocinas pueden activar las células directamente, después de unirse al receptor de superficie, o indirectamente por la activación de otras células para la liberación de citocinas que también inducirán la muerte intracelular. La liberación de la IL-1 también está asociada con el aumento de la actividad fagocítica y citotóxica de los macrófagos.²³

Las citocinas han mostrado que influyen en el curso de la infección por coccidias. Recientemente se han identificado parcialmente las linfocinas IL-2 e INF γ en las infecciones por coccidia en pollos, y estas se han utilizado para producir inmunoprolifaxis contra este parásito.^{7,3}

1.3.- CULTIVO CELULAR

1.3.1.- Cultivo de células epiteliales.

El término de cultivo celular se utiliza para el crecimiento de células *in vitro*. En los cultivos celulares las células no se organizan nunca para formar tejidos. El cultivo primario es originado de células de órganos o tejidos que proceden directamente del animal.^{21,24,17}

La tendencia de las células epiteliales a unirse y formar láminas extensas persiste con mucha frecuencia en los cultivos cuando existe una superficie adecuada, como sucede en un cubreobjetos, en el fondo de una placa o la interfase entre un coágulo de plasma y un medio líquido. Cuando se cultivan explantes primarios ricos en células epiteliales, las láminas se forman frecuentemente al cabo de un día o dos en la periferia del explante y de manera gradual se extienden por toda la superficie de la placa. Los epitelios tienden a presentar una superficie lisa con escasas proyecciones, y sus núcleos contienen uno o dos nucleolos bien definidos. El citoplasma es moderadamente denso; distribuyéndose en él mitocondrias filamentosas y ocasionalmente existen cuerpos esféricos oscuros que pueden corresponder a lisosomas.²¹

1.3.2.- Ventajas y desventajas del cultivo celular

Los cultivos celulares pueden mantenerse en condiciones ambientales controladas y puede experimentarse en ellos directamente *in vivo*. Es difícil administrar reactivos directamente a un tipo de células en particular, así como hacerlo en una concentración adecuada. Los cultivos celulares primarios son los que se aproximan más a la situación *in vivo*. Los cultivos primarios de células animales es una técnica usada comúnmente en el plano de la medicina y la biología celular y la biología molecular.^{18, 24}

Todos los sistemas de cultivo celular comparten algunas desventajas, como son la sobresimplificación de la situación natural ya que las células son aisladas de otras células con las cuales interactúan. El establecimiento de procedimientos rigurosos para disminuir la contaminación por microorganismos, como consecuencia tienen desventajas del cultivo fresco.²⁴

Comunmente son heterogéneos, los procedimientos cambian de día a día y las preparaciones celulares no son siempre idénticas, son costosos y se necesita tiempo para su preparación y las células solo tienen un corto tiempo de vida.²⁴

Se han encontrado factores que juegan un papel en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales, éstos incluyen componentes de matriz extracelular, interacciones mesenquimal-parenquimales, poliaminas y hormonas; por lo cual estas células *in vitro* tienen dificultades en el crecimiento limitando su aplicación.²

Los cultivos de células primarias han sido ampliamente usados en varios tipos de estudio y son muy útiles para el aislamiento e identificación de patógenos aviáres.¹⁷

Esta técnica puede ser útil para varias aplicaciones incluyendo el aislamiento de enteropatógenos y para estudios básicos del tracto intestinal relacionados con áreas tales como fisiología, inmunología y toxicología.¹⁸

1.4.- JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Es poco lo que se conoce acerca de como actúan exactamente los mecanismos patogénicos del parásito en la infección, ni como funcionan los mecanismos inmunológicos

que utilizan las aves para protegerse de las coccidias. En los últimos años esta situación ha conducido hacia el estudio inmunológico de esta relación.¹²

Algunos factores solubles derivados de LT (linfocinas), están involucrados en la defensa inmune contra la coccidiosis. La aplicación de este tipo de sobrenadantes estimulados con concanavalina A (Con-A) por vía intravenosa e intramuscular protegen parcialmente contra la infección por *E. tenella*. Estos mismos sobrenadantes han sido capaces de inhibir el desarrollo de esporozoitos en cultivos celulares, obteniéndose resultados semejantes con la estimulación de los LT con antígenos de coccidia; los cuales aunque no tuvieron un efecto citotóxico sobre los esporozoitos, abatieron la habilidad de los macrófagos para transferir esporozoitos a un cultivo de células de riñón de bovino. Es por eso que primeramente hay que desarrollar un modelo *in vitro* confiable y lo más cercano al modelo *in vivo* que permita estudiar el mecanismo inmunológico responsable de controlar y erradicar la infección por *Eimeria tenella* utilizando la cepa QRO (MOR-80) y cultivos celulares.^{12,10,9}

El entendimiento de la respuesta inmune en los pollos, puede propiciar el desarrollo de la profilaxis en esta y otras enfermedades que afecten el tracto digestivo. Es por eso que se debe caracterizar *in vitro* las células epiteliales y si son susceptibles a la infección, para estudiar mecanismos de la infección e inmunidad de *Eimerias* aviares.^{7,3}

El cultivo primario será una adaptación de las técnicas que se utilizaron para obtener células entéricas de yeyuno de pavo y de duodeno de pollo con el fin de obtener de ciego, para ser infectadas con esporozoitos de *Eimeria tenella*; obteniendo así un modelo viable que sirva para realizar futuros estudios de la inmunidad contra dicho parásito.^{2,5}

II.-HIPOTESIS

Adaptando las técnicas de cultivo primario de enterocitos duodenales de pollo, se puede realizar un cultivo celular primario de enterocitos cecales de pollo y éste será susceptible a la infección por esporozoitos de *Eimeria tenella*.

III.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Obtener un cultivo celular de enterocitos cecales de pollo que sirva para realizar estudios *in vitro* de la inmunidad celular en infecciones intracelulares por *Eimeria tenella*.

3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Adaptar el método adecuado para la obtención de un cultivo primario de enterocitos cecales de pollo.
- El cultivo primario de células cecales puede ser susceptible a la infección con esporozoitos de *Eimeria tenella*.

IV.- MATERIAL Y METODOS

4.1.- ESTRATEGIA GENERAL.

Para el desarrollo del presente trabajo se llevaron a cabo tres fases:

*- Desarrollo de el cultivo celular primario de enterocitos de pollo, para el cual se prepararon las siguientes soluciones y medios: medio de aislamiento, de incubación y solución salina fisiológica. En el desarrollo de el cultivo celular se realizó la adaptación de la técnica para obtener la concentración celular adecuada para la infección, y el establecimiento del tiempo de vida del cultivo celular sin infección alguna.

Para la verificación del proceso y de la obtención de las células epiteliales se realizó un estudio histológico de los tejidos de ciego y de duodeno procesados y sin procesar.

*- Preparación de los esporozoitos, para la cual se llevó a cabo la desinfección de los ooquistes y la liberación de los esporozoitos.

*- La infección de las células con los esporozoitos y la observación del proceso.

MÉTODOS

4.2.- CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE ENTEROCITOS DE POLLO.

4.2.1.- Medio de aislamiento.

Se preparó medio RPMI 1640 al cual se le adicionó para preparar un litro de medio de aislamiento 2g. de bicarbonato de sodio, Tetracetato disodio etilendiamina (EDTA) c.b.p.igualar una solución de 1.5mM, HEPES c.b.p.igualar una solución a 25mM., 10 g de Fracción V de albúmina de suero bovino (BSA), y se le agregó antibiótico 100,000U de penicilina y 100,000 µg de estreptomina. Dicha solución se mezcló con la barra magnética en la platina magnética; bajo la campana de flujo laminar se esterilizó el medio usando un filtro de 0.2µm. Y se calibró el pH a 5.0 con una solución de ácido clorhídrico a 1M. Una vez terminada la mezcla se almacenó en botellas de 500 ml. a 4°C.

4.2.2.- Medio de incubación.

Se prepara igual que el medio de aislamiento, pero este difiere ya que su concentración de BSA será de 1.0 g obteniendo una solución al 0.1% y se le agregaron 100ml de Suero Fetal Bovino (SFB) para obtener una solución al 10% . Dicha solución se mezcló con la barra magnética en la platina magnética conservando un pH de 7.0.

4.2.3.- Solución Salina Fisiológica. (SSF)

Para preparar 1 litro de agua bidestilada se agregó 9.0 g de cloruro de sodio y se mezcló hasta que esté completamente disuelto. Se vació a botellas de 500 ml. y se esterilizó.

4.2.4.- *Obtención del cultivo celular.*

Se sacrificaron 4 aves de 18 a 20 semanas de edad de la estirpe Avian farm por dislocación cervical, se sumergieron en agua para mojar las plumas; De manera estéril se incidió cavidad abdominal con tijeras se separó el ciego por disección del mesenterio y del tejido conectivo haciendo después un corte transversal separando los sacos ciegos y finalmente extrayéndose; del mismo modo se extrajo el duodeno . Se colocaron en las cajas petri estériles con SSF, así se transportaron al laboratorio de investigación, ya en la campana se abrieron las cajas y se les fué diseccionando las partículas de serosa y tejido conectivo restantes. Se hizo una incisión longitudinal extendiendo de este modo los tejidos y exponiendo su mucosa; se hicieron tres lavados a cada órgano con SSF quitando todo el contenido intestinal. Al ser lavado la porción de ciego este giro inversamente a su posición original .

Las porciones de ciego y duodeno se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml. por separado, que contenían 20 ml. del medio de aislamiento. Los tubos se sellaron con parafilm y se colocaron en el Shaker por 30 minutos a 37°C a 200 rev. por minuto.

Se filtró la solución con mallas de organza a tubos de centrifuga de 15 ml. Estos se metieron a la centrifuga a 4°C a 900 rev.. (100xg) por 5 minutos. El precipitado que se observó en las células de ciego fue mucho menor que las de duodeno.

Se cambió el sobrenadante usando pipetas de 10 ml. primero se extrajo todo el sobrenadante (sin el botón). Después se le agregó 5ml. del medio de aislamiento se agitó con la pipeta. Una vez homogeneizada la suspensión, se agregaron los 10 ml más del medio, una vez hecho esto se volvió a centrifugar repitiéndose el lavado una vez más con el medio de aislamiento y otra con el medio de incubación.

4.2.5.- Obtención de la concentración celular y establecimiento de tiempo de vida.

Se resuspendió para hacer el conteo de la viabilidad. Se extrajo a tubos de polipropileno de 1.5ml. 0.1ml. del medio con células (duodeno y ciego) 0.2 ml. de Trypan azul y 0.7 ml. de medio de incubación sin células, se agitó hacia arriba y hacia abajo para mezclar. Se llenó el hemocitómetro a su capacidad y se realizó el conteo celular determinándose también la viabilidad, se observó en el microscopio con un aumento de 400x. Después de determinar la concentración celular y su viabilidad se realizaron diluciones para determinar la concentración adecuada para la infección.

Una vez contadas las células y lograda la concentración celular deseada las cajas de cultivo se colocan en la estufa de cultivo celular a una temperatura de 37°C con un porcentaje de CO₂ de 4.0% .

Se mantuvo el cultivo celular en la estufa y se manejaron 6 grupos celulares en los cuales 3 grupos fueron de ciego de los cuales a un grupo se les cambió el medio de incubación cada tercer día, al segundo grupo se les cambió el medio de incubación diariamente y al tercer grupo no se la cambió el medio.

Se manejaron 3 grupos de duodeno, en los cuales se manejó el mismo criterio de agrupación para determinar en cada uno de ellos el tiempo de vida y encontrar diferencia entre el cultivo celular de duodeno y de ciego.

4.2.6.- Verificación del proceso.

Para la verificación del proceso y de la obtención de las células epiteliales, se realizó un estudio histológico de los tejidos de ciego y de duodeno fijando fracciones de duodeno y de ciego, antes del proceso, es decir, al momento de extraerlos del ave y después de el proceso de disociación celular en el Shaker, en formol bufferado al 10% durante 24 horas y después, siguiendo el proceso de parafinado y de tinción de HE normal ser observados al microscopio óptico.

4.3.- PREPARACIÓN DE ESPOROZOITOS..

4.3.1.- Desinfección de oocistos.

Los oocistos de E. tenella de la cepa QRO (MOR-80) fueron lavados repetidamente con agua destilada para quitar el dicromato de potasio, que se utilizó para que esporularan, antes de desinfectarlos. Se cloraron para su desinfección con hipoclorito de sodio al 4% por 30 minutos a 4°C. y se mantuvieron en HBSS estéril con un pH de 7.4 a 4°C hasta usarse para el experimento.

4.3.2.- Preparación de los esporozoitos.

Para la preparación de los esporozoitos se utilizaron oocistos a una concentración aproximadamente de 2×10^6 suspendidos en un volumen de 3 a 5ml. de HBSS en un tubo de centrifuga que contenía 5 ml de perlas de vidrio y se centrifugaron de 30 a 60 segundos hasta que se hayan roto el 80% de los oocistos observando esto por microscopia. Las perlas de vidrio son lavadas con 50 ml. de HBSS y los esporocistos fueron concentrados por centrifugación por 10 minutos a 1875 xg. El sobrenadante se extrae y los esporocistos concentrados se resuspendieron en 50 ml. de solución con: 50 ml. de HBSS con 0.375g. de ácido taurodeocicólico y 0.125 g de tripsina. Esta suspensión de esporocistos se incubó a 40.5°C por aproximadamente 40 minutos. Los esporozoitos fueron separados de los detritos celulares y de los oocistos intactos por filtración por filtros con poros de 11 µm.

4.4.-INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CON LOS ESPOROZOITOS

Una vez establecida la concentración celular con la que se realizaría la infección, se hizo un último cultivo celular en el cual se manejaron 3 grupos:

1.- El grupo de la infección en el cual se utilizó una relación de 1 esporozoito por 50 células cecales, utilizando así 4000 esporozoitos por 1ml. y 200, 000 células por 1 ml. esta mezcla se centrifugó por 5 minutos a 100 xg. Después de la centrifugación se resuspendió la mezcla y usando puntas de pipeta de 1000µl se sembraron 200 µl en el plato de cultivo celular Microtest III 96-well.

2.- El grupo control de células sin infección para observar su comportamiento sin infección.

3.- El grupo control de esporozoitos sin células para observar los cambios de estos durante los días de la infección.

Después se colocaron las placas de cultivo en la estufa de cultivo celular a 37°C con 4.0% de CO₂.

Se evaluó la infección *in vivo* en la placa de cultivo celular durante las 2, 12, 24, 48 y 72 horas consecutivas a la infección, así como a los 4, 5, 6 y 7 días, reemplazándoles el medio cada tercer día.

MATERIAL

A.- QUIMICOS Y MEDIOS DE CULTIVO:

- RPMI 1640 Talco con glutamina
- Fracción V de albúmina de suero bovino (BSA)
- Suero Fetal Bovino
- HEPES (N-2 hidroxietilpiperacina-N-2-etanosulfónico)
- Tetracetato disodio etilendiamina (EDTA)
- Hipoclorito de sodio
- Solución de Hank's salina balanceada (HBSS)
- Tripsina
- Bicarbonato de sodio
- Penicilina/Estreptomicina
- Cloruro de sodio
- Dicromato de potasio
- Acido taurodiocólico

B.- UTENSILIOS DE VIDRIO Y PLASTICO:

- Tubos cónicos de centrifuga 50 ml. y 15 ml.
- Plato para cultivo Microtest III 96 well.
- Jeringas desechables de 20 ml.
- Shaker orbital
- Pipetman de 200µl y 1000µl.
- Pinzas de disección.
- Tijeras de disección curvas.
- Perlas de vidrio
- Puntas de pipeta de 200µl.
- Pipetas desechables de 20 ml.
- Baño María
- Centrifuga
- Hemocitómetro
- Tijeras de disección rectas
- Platina magnética.

C.- ANIMALES

- Aves de 18 a 20 semanas de edad, de estirpe Avian farm.

V.- RESULTADOS

5.1.- CULTIVO CELULAR.

5.1.1.- Obtención del cultivo celular.

Se desarrollaron cultivos primarios de células enterocíticas de pollo duodenales y cecales viables, en éstos se encontró diferencia en la cantidad celular obtenida entre uno y otro, siendo mayor la concentración celular obtenida a partir del cultivo celular de enterocitos duodenales.

Durante el desarrollo de la elaboración del cultivo celular se observó diferencia en el pH del medio de aislamiento de las células cecales, ya que este es más ácido que el de las células duodenales después de el proceso de disociación celular en el Shaker a 200 rpm.

Se observó que en los cultivos celulares en donde no se cambió el medio de incubación su tiempo de vida era mucho menor que en aquellos en los que se llevó a cabo cada tercer día o diariamente; sin embargo la concentración celular en los cultivos en los que se cambió el medio diariamente fue mucho menor, y fue disminuyendo debido a la pérdida de células durante este.

5.1.2.- Obtención de la concentración celular y establecimiento del tiempo de vida.

Los cultivos celular sin infección alguna duran de 3 a 4 semanas, cuando se les cambia el medio de incubación diariamente o cada tercer día.

Al realizar el conteo celular si se obtenía una concentración mayor de la deseada se diluían con medio de incubación.

Se ajustó la concentración celular para que fuera más visible la observación de la infección. Se probó la concentración obtenida de duodeno sin hacer dilución que fue de 1,100,000 células por mililitro y no se observó claramente las células debido a que había sobre población y por lo tanto se formaban estratos celulares con células sobrepuestas. Después se realizó una dilución de la concentración obtenida a una concentración de

800,000 células por mililitro (fig.1); al obtener esta concentración se logró determinar que solo diferían en tamaño, las células de duodenales de las cecales; sin embargo aún a esta concentración las células se veían muy juntas obteniéndose confluencia en los pozos del plato de cultivo, pero no permitían la clara observación de la infección por los esporozoitos. Se realizó una última dilución a 200,000 células por mililitro con lo cual a pesar de que no se logró confluencia era una concentración adecuada para la apreciación de la infección. (fig.2).

5.2.- INFECCIÓN CELULAR CON ESPOROZOITOS

El control de células enterocíticas no presentaron ningún cambio, manteniéndose estables en número y forma hasta el final de la infección experimental. (fig.3)

El control de esporozoitos se mantuvo en movimiento constante de éstos hasta aproximadamente el quinto día en el cual éstos aún se movían pero su tamaño había disminuido considerablemente. (fig.4)

Se observó el cultivo a las 2 horas después de sembrarse en el plato de cultivo, sin embargo no es muy evidente la infección debido a que todavía no se encontraba del todo el material en el fondo del pozo.(fig.5)

La infección celular se comenzó a observar aproximadamente a las 12 horas cuando las células se fijan en el fondo de los pozos de la placa de cultivo de incubación y se logra observar el movimiento de los esporozoitos y el aumento de tamaño de algunas células.(fig.6)

A las 24 horas se observan algunas células con citomegalia; y de color más oscuro así como esporozoitos con bastante movimiento. (fig.7)

A las 48 horas en el cultivo celular hubo un mayor número de células con estructuras internas que aparentemente son esquizontes; se realizó cambio de medio de incubación, y se dejó se volvieran a fijar las células al fondo del pozo. (fig. 8)

A las 72 horas se incrementó la cantidad de células con citomegalia y se observaron algunas otras con las estructuras antes mencionadas que podrían corresponder a la primera fase de la infección observándose la formación de esquizontes; sin embargo no se logran distinguir claramente .

Al quinto día se lograron apreciar estructuras en el interior de algunas células con formación de otras estructuras que corresponden aparentemente a la formación de oocistos, y se siguen presentando algunas células con la formación de esquizontes.

No se logró identificar la fase de los esquizontes que se observaron debido a que las características de éstos son muy similares y la capacidad de aumento del microscopio fué muy limitado.

5.3.- VERIFICACION DEL PROCESO.

En el estudio histológico en el que se tomaron muestras de duodeno y de ciego, al momento de extraerlos del ave, se observó al microscopio a un aumento de 40x el epitelio tanto de duodeno y ciego con sus vellosidades integras con las células epiteliales bien definidas. (fig. 9,11)

Así mismo de las muestras que se tomaron de éstos tejidos después del proceso de disociación celular en el Shaker se observaron al microscopio óptico a un aumento de 40x y se verificó la pérdida del epitelio, por lo tanto se considera que en el desarrollo del cultivo celular se obtienen células epiteliales de éstos tejidos. (fig. 10, 12)

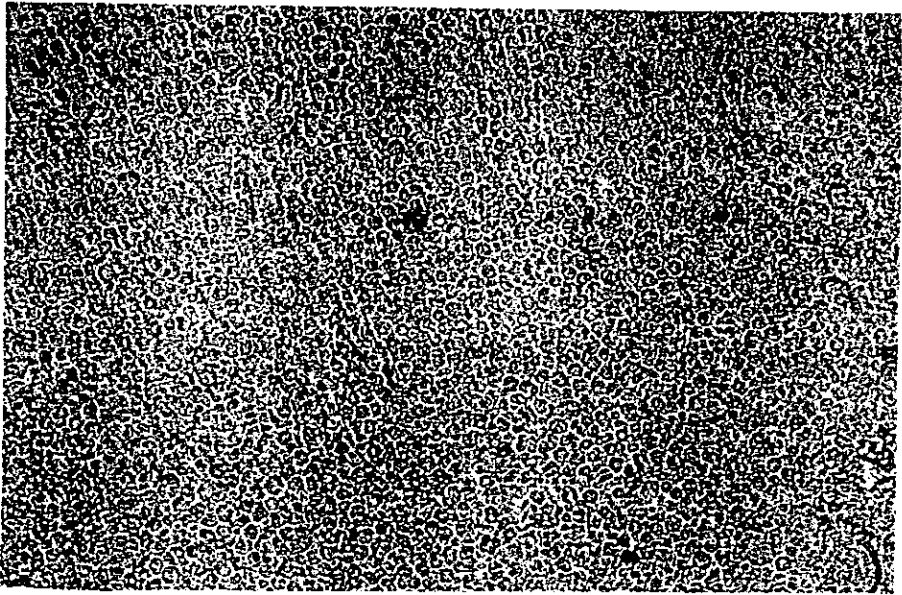


Fig. 1.- Microfotografía de células cecales a las 24 horas en cultivo celular a una concentración de 800,000 células por mililitro a un aumento de 125x.

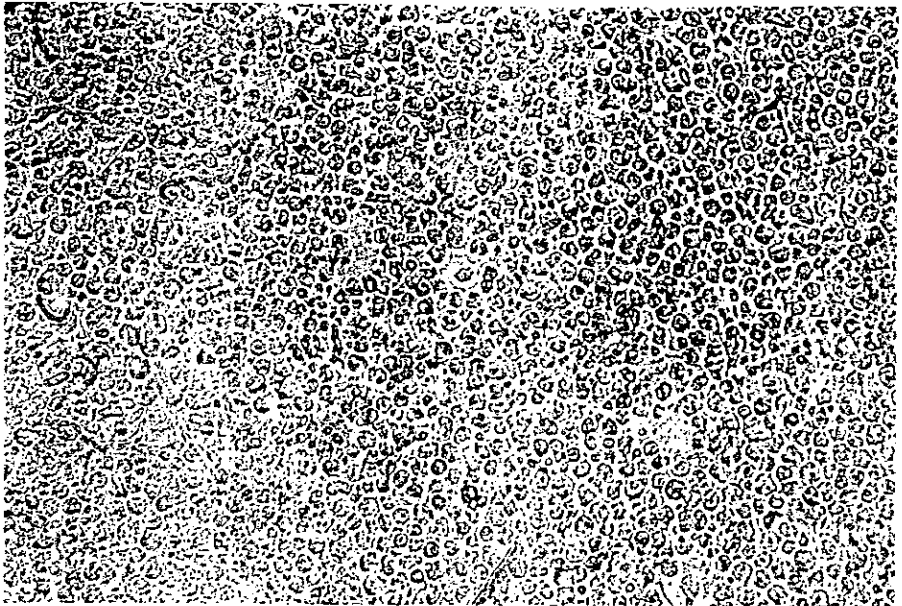


Fig. 2.- Microfotografía del control de células de ciego a las 24 horas en cultivo celular a una concentración de 200,000 células por mililitro a un aumento de 125x.

Claves utilizadas: A- Células normales

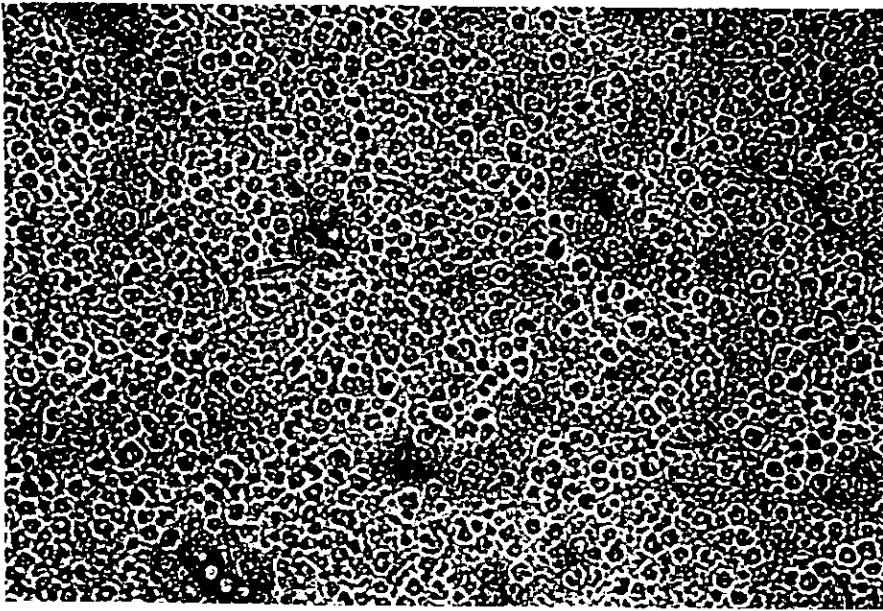


Fig.3.- Microfotografía del control de células de duodeno a las 24 horas en cultivo celular a una concentración de 200,000 células por mililitro a un aumento de 125x.

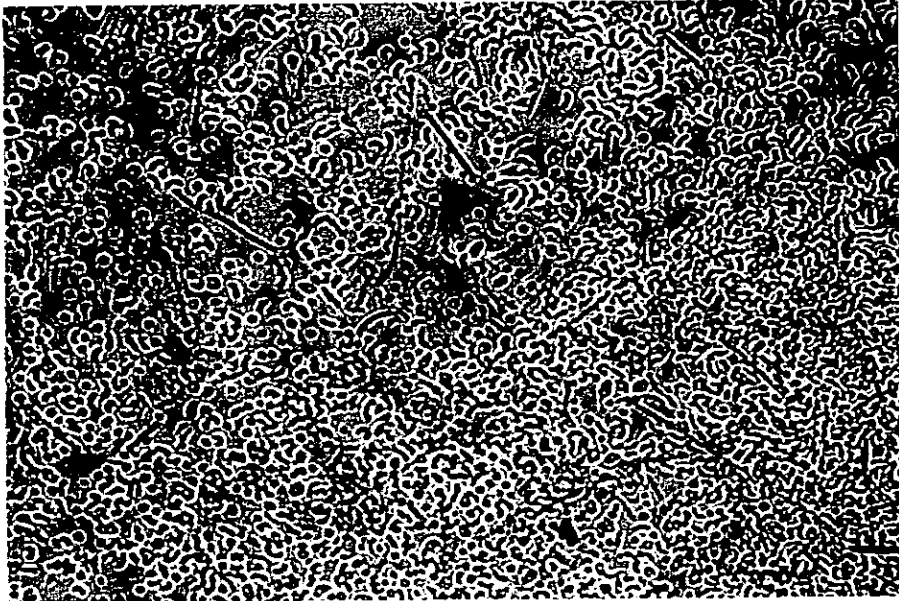


Fig.4.- Microfotografía del control de esporozoitos a las 24 horas a un aumento de 125x.

Claves utilizadas: A- Células normales E- Esporozoitos

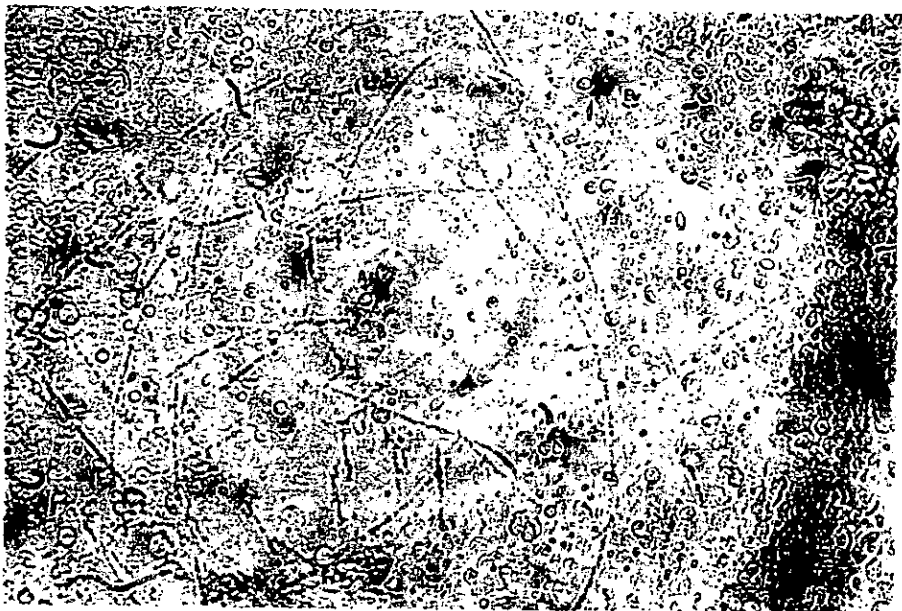


Fig. 5.- Microfotografía de enterocitos a las 2 horas postinfección en cultivo celular a un aumento de 125x.

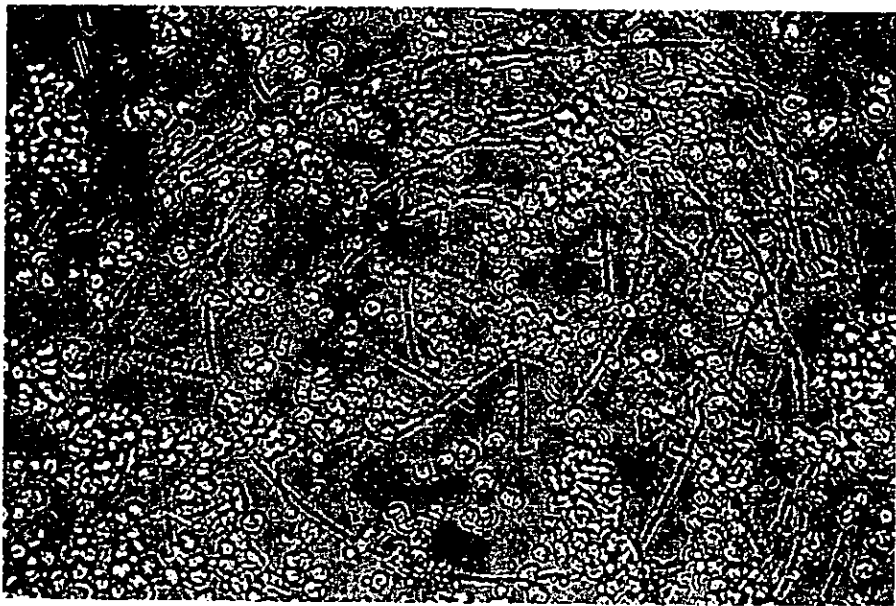


Fig. 6.- Microfotografía de células cecales a las 12 horas postinfección con células con citomegalia en cultivo celular a 125 x.

Claves utilizadas:

A- Células normales B- Células con citomegalia E- Esporozoitos

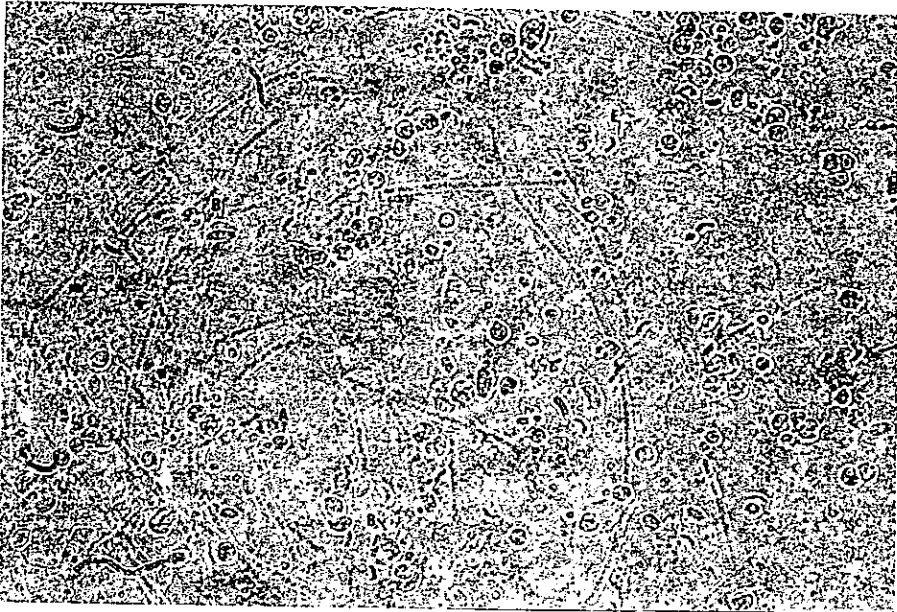


Fig. 7.-Microfotografía de células de ciego a las 24 horas postinfección con citomegalia en cultivo celular a un aumento de 125x.

Claves utilizadas:

A- Células normales B- Células con citomegalia E- Esporozoitos

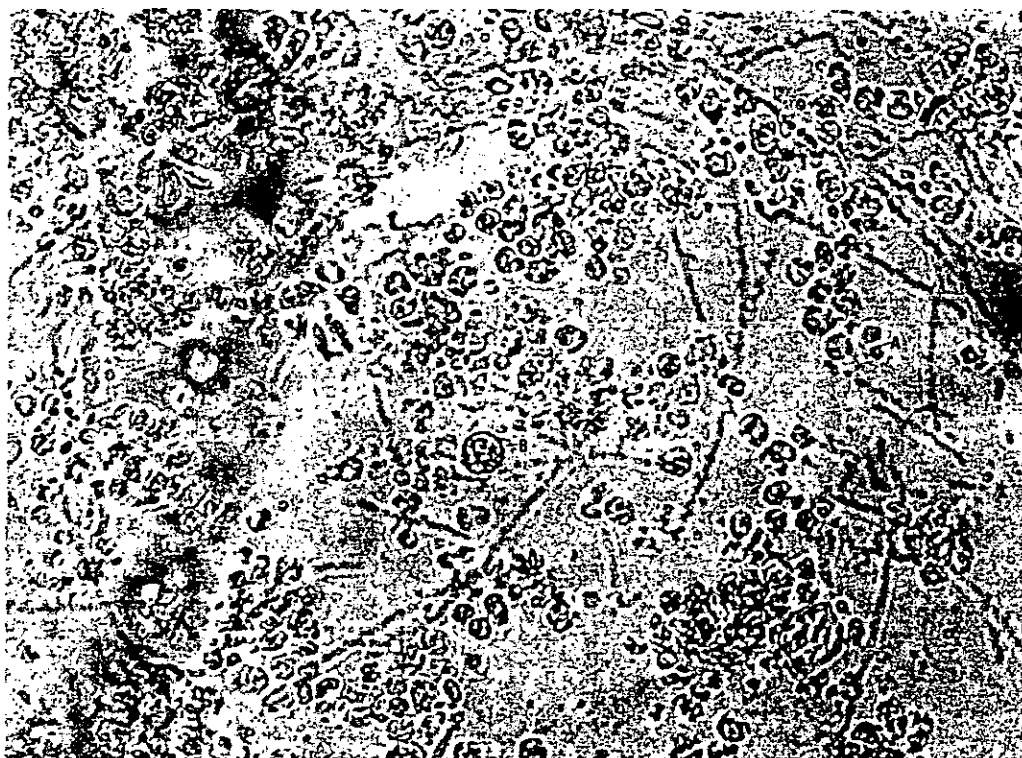


Fig. 8.-Acercamiento de una microfotografía a un aumento de 125x de células cecales infectadas a las 48 horas postinfección con citomegalia y estructuras internas.

Claves utilizadas:

A- Células normales B- Células con citomegalia E- Esporozoitos



Fig. 9.-Microfotografía de un fragmento de ciego antes del proceso para cultivo celular; fijado en formol utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina a un aumento de 40x.



Fig. 10.- Microfotografía de un fragmento de ciego después del proceso para cultivo celular, fijado en formol utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina a un aumento de 40x.

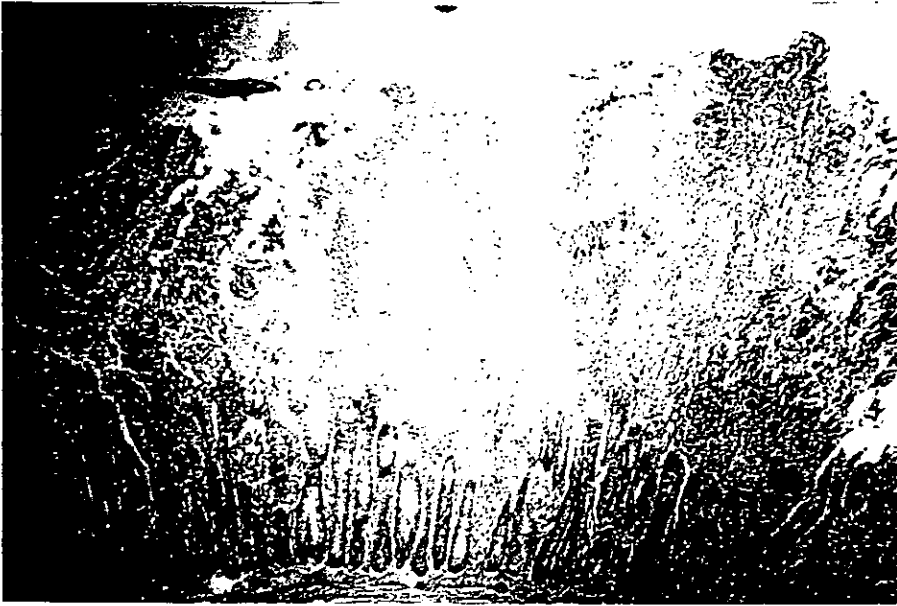


Fig. 11.-Microfotografía de un fragmento de duodeno antes del proceso para cultivo celular; fijado en formol utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina a un aumento de 40x.



Fig. 12.-Microfotografía de un fragmento de duodeno después del proceso para cultivo celular; fijado en formol utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina a un aumento de 40x.

VI.- DISCUSION

La presente técnica de cultivo celular es una modificación de la técnica descrita por Caldwell, D.J. y col. (1993), para el aislamiento y cultivo primario de células epiteliales intestinales de pollo, obteniéndolas del duodeno. En el presente trabajo se realizan cambios basándose en las dificultades encontradas en los ensayos del aislamiento, modificando el tiempo de agitación en el Shaker para obtener mayor cantidad de células cecales, así mismo se modificó el tamaño de las fracciones de intestino que se procesan, también se modificó la concentración celular que sugiere Caldwell y col. de 1.0×10^5 para poder observar con claridad la infección celular determinando así en este trabajo una concentración final celular de 200,000 células por mililitro. Se ajustó la técnica al material que se posee en el laboratorio, por ejemplo utilizando mayas de organza estériles en lugar de maya de nylon nitex de 60 μm de diámetro con excelentes resultados. Así mismo se sustituyó el agitador orbital con baño de agua por el Shaker sencillo que se encuentra en el laboratorio.

Se encontraron diferencias entre la técnica para el aislamiento de células duodenales y cecales; en el caso de las células epiteliales del ciego se obtenía una menor cantidad de enterocitos cecales que duodenales debido a el tamaño o superficie del ciego es menor que la de el duodeno, además de que la superficie epitelial en el duodeno presenta vellosidades más largas lo cual hace que exista una mayor superficie epitelial con más células epiteliales, por lo tanto la superficie cecal debe ser más grande para obtener una concentración celular similar a la de duodeno.

Akbar y Donald en 1996 también logran hacer un cultivo primario de células epiteliales intestinales de pavo, sin embargo esta técnica es mas complicada y laboriosa ya que utiliza una monocapa de fibroblastos intestinales alimentadora y otra línea alimentadora de fibroblastos de ratón 3T3 para finalmente realizar el aislamiento de células epiteliales intestinales de pavos; en cambio esta técnica es mucho más rápida y sencilla sin necesidad de monocapas alimentadoras de estas células requiriendo solamente para mantenerse vivas en el medio de cultivo que se preparó.

Otra modificación que se realizó en la presente técnica consistió en la disminución de pH en el medio de aislamiento como lo aconseja Caldwell, D.J. (1993) disminuyéndolo a un pH de 6.5 con una solución de ácido clorhídrico a una concentración de 1 M para las células duodenales y las cecales para lograr la morfología columnar de las células epiteliales. Akbar y Reynolds (1996) no obtienen células columnares, encontrando mayor variabilidad en la morfología. En este trabajo se obtuvo un alto índice de dimorfismo, sin embargo si se logró aislar células con la morfología columnar, pero estas iban perdiendo su morfología original al paso de las horas.

En este estudio no se observaron fases mitóticas en las células y por lo tanto no se realizó la producción de una línea celular, sino un cultivo celular primario el cual tiene las características requeridas para que se lleve a cabo la infección con los esporozoitos y se puedan desarrollar las fases de dicha infección. Aunque Wigley C.B. (1995) menciona que a pesar de que las células epiteliales se reproducen rápidamente *in vivo*, esto no se lleva a cabo en los cultivos celulares a menos que se les adicione en el medio el Factor de Crecimiento Epitelial (FCE).

Zhang y col. en 1996, logran aumentar la producción de ooquistes en un cultivo primario de células de riñón de pollo obteniendo buenos resultados con una suplementación a su medio con un 10% de Suero Fetal Bovino en lugar de suero de pollo, en el presente estudio se utilizó dicha cantidad de Suero Fetal Bovino para el medio de incubación, por lo tanto no se consideró agregar una cantidad mayor de este para la infección.

Así mismo Zhang (1996) y Caldwell y col. (1993) realizaron cambios de medio diario al cultivo celular mientras que en el estudio realizado se tomó la decisión de hacer cambio de medio cada tercer día ya que la concentración celular en cada cambio de medio disminuía considerablemente.

Zhang (1996) menciona que al disminuir el pH a 7.0 tuvo mejores resultados en la producción de ooquistes que a un pH de 8.0 no así al disminuir el pH a 6.0. No se debe olvidar que Vicente (1994) menciona que en el ciego se mantiene un pH luminal ácido de 6.519 el cual no solamente ejerce un efecto negativo sobre el metabolismo bacteriano, sino que también modifica los receptores celulares epiteliales, debido a un incremento en la división celular a través de la activación de la síntesis de DNA impidiendo de esta manera la adhesión e invasión de agentes patológicos. Se utilizó en este trabajo un pH de 7.4 en el medio de incubación, por lo tanto se debe tener cuidado al manejar el pH, se consideró adecuado realizar con el modelo realizado en este estudio modificaciones al pH en el medio de incubación, para poder observar ventajas y desventajas. Se considera al pH ácido natural del ciego como causa de la disminución del pH del medio de aislamiento que se mostraba en los tubos de centrifuga después del proceso de disociación celular en el Shaker a 200 rev. por minuto a diferencia del pH que presentaba el tubo de centrifuga que contenía el duodeno.

Zhang y col. en 1997 realiza una adaptación de *Eimeria tenella* para su crecimiento en células primarias de riñón de pollo, después de hacer pases repetidos entre cultivo celular y pollo, mediante la selección por sus características parasitarias; logró producir 14 generaciones de *Eimeria tenella* después de pasajes repetidos en células de riñón y pollos. Obtuvo de las generaciones de la 1 a la 14 una mayor tendencia para causar infecciones múltiples dentro de la misma célula huésped no siendo así en la generación 0 (en la primer infección en cultivo celular). Llegó a observar dos, tres y ocasionalmente cuatro ooquistes dentro de una célula renal. Esto podría indicar que *Eimeria tenella* se va adaptando al cultivo celular con mayor facilidad después de la primera infección en cultivo celular, por

lo tanto podría intentarse realizar esta adaptación a través de pases de cultivo celular y la infección en pollo para obtener del mismo modo infecciones múltiples.

Los cultivos renales infectados por *Eimeria tenella* realizados por Doran (1971) y Zhang y col. (1996) son obtenidos de pollos de 2 a 4 semanas de edad mientras en el cultivo realizado por Caldwell y col. (1993) y en el presente estudio es obtenido de pollos de edades de mas de 18 semanas de edad debido al tamaño del tejido que se necesitaba.

Kogut, M.H. y Slajcher, T en 1992 logran demostrar la protección conferida por los linfocitos T contra *Eimeria tenella* a través de la producción de linfocinas, utilizando la infección por este parásito en células renales, obteniendo resultados positivos con un efecto significativo en la disminución de las células infectadas tratadas con las linfocinas. Este estudio podría realizarse en este modelo de cultivo celular de enterocitos de pollo, ya sea en ciego o duodeno, ya que no se encontraron diferencias en los resultados obtenidos por la infección en células de duodeno ni de ciego, lo que nos demuestra que al ser infectado el modelo presentado en esta investigación por los esporozoitos también puede presentar una susceptibilidad a reaccionar como *in vivo* a las linfocinas, produciendo una respuesta inmunoprotectora a dicho parásito.

Del mismo modo se pueden realizar pruebas inmunológicas como las realizadas por García (1995) y Alfaro en (1997) probando inmunoprolifaxis mediante el uso de linfocinas.

VII.- CONCLUSION

En la presente investigación se logró el desarrollo del cultivo primario de enterocitos cecales y duodenales de pollo. Concluyendo que la concentración óptima de células en dicho cultivo debe de ser de 200,000 células por mililitro para observar con claridad la infección con los esporozoitos.

Se encontró diferencia entre el tamaño de las células de duodeno y ciego, siendo visualmente más grandes las células duodenales.

No se encontraron diferencias en el desarrollo de la infección en el cultivo celular de enterocitos de pollo cecales y duodenales, lográndose la infección en ambos tipos de células; en las que se observó citomegalia.

Se concluye que este método de cultivo celular es efectivo, simple y fácil de desarrollar en cualquier laboratorio.

El tiempo óptimo de infección es de 24 a 48 horas tiempo suficiente para que se infecten las células, ya que es necesario cambiar el medio de incubación a las células a las 48 horas y en dicho cambio de medio se retiran los esporozoitos libres. El tiempo óptimo para observar todas las fases del parásito es de siete días, tiempo en el cual se sabe se forman los ooquistes.

Aunado a éstos resultados se logró demostrar que el cultivo celular de enterocitos de pollo, sirve como modelo *in vitro* para intracelulares por Eimeria tenella .

Como corolario final, se demostró la veracidad de la hipótesis inicial de esta investigación.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Celular and molecular immunology. 2a ed. Philadelphia: Saunders press, 1994.
- 2.- Akbar A, Reynolds DL. Primary cell culture of turkey intestinal epithelial cells. Avian Sis 1996; 40: 103-108.
- 3.- Alfaro JCC. Inmunoprofilaxis contra infecciones por *Eimeria tenella* y *Salmonella enteritidis* mediante el uso de linfocinas. México (D.F.) Univ. Nal. Aut. de Méx., 1997.
- 4.- Allen PC, Danforth HD, Levander OA. Diets high in n-3 fatty acids reduce cecal lesion scores in chicken infected with *Eimeria tenella*. Poulit Sc 1996;75:179-185.
- 5.- Caldwell RE, Droleskey HM, Elissalde HM, Kogut MH, Deloach JR, Hargis BM. Isolation and primary culture of chicken intestinal epithelial cells retaining normal in vivo likemorphology. J Tiss Cul Meth 1993; 15:15-18.
- 6.- Doran DJ. Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. The Journal of Parasitology 1971, 57:891-900.
- 7.- García EG. Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar. México (D.F.): Univ. Nal. Aut. de Méx., 1995.
- 8.- Gordon RF, Jordan FTW. Enfermedades de las aves. 2a ed. México. El manual moderno, S.A. de C.V., 1985.

- 9.- Juárez EM, Téllez IG, Petrone VM, Cabriales JJ. El rol de los linfocitos T CD8 en la inmunidad contra la coccidiosis aviar. Memorias de la VI Jornada Médico Avícola; 1997 marzo 12-14; México (DF): División de Educación Continua, Departamento de Producción Animal: Aves y Asociación Nacional de especialistas en Ciencias Avícolas, 1997: 128-136.
- 10.- Kogut MH, Slajchert T. T-Lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Imm & Infect Dis* 1992; 2: 69-79.
- 11.- Lillehoj HS, Trout JM. Coccidia a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Path* 1993; 22: 3-31.
- 12.- Lillehoj HS, Sasai K. Development and characterizaion of chicken-chicken B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite antigens of *Eimeria* . *Poult Sci*; 1994; 173:1685-1693.
- 13.- Mc Dougal RL, Reid MN. Coccidiosis. In: Calneck BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, editors. *Disease of poultry*. 9a ed. Iowa: Iowa State University Press, 1991:780-787.
- 14.- Moreno DR, Quiroz AH, Mosqueda TA, Meza BR. Patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. *Vet Mex* 1980; 11: 1-7.
- 15.- Moreno DR. Enfermedades parasitarias de las aves. Tomo II, 2a ed. México. Universidad Nacional Autónoma de México, 1989.

- 16.- Moreno DR. Endoparásitos más frecuentes en gallinas. Memorias de la III Jornada Médico Avícola;1992; México (DF): División de Educación Continua, Departamento de Producción Animal: Aves, Asociación Nacional de especialistas en Ciencias Avícolas, 1992:146-148.
- 17.- Paul J. Cell and tissue culture. 5a ed. Great Britain. Churchill livingstone, 1975.
- 18.- Quiroz HR. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 1a ed. UTEHA Noriega Editores, 1984.
- 19.- Rubio GME. Utilidad de las necropsias y score de lesiones en el diagnóstico de coccidiosis aviar. Memorias del Curso de Actualización sobre coccidiosis Aviar. 1994, México (DF):Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1994: 87-93.
- 20.- Ruiz HR. Coccidiosis Aviar. 1a. ed. Venezuela: Universidad Central de Venezuela, 1990.
- 21.- Sharp JA. Introducción al cultivo de los tejidos animales. 1a. ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1980.
- 22.- Vicente SJL. Efecto de la administración prolongada de semilla de paprika en la dieta sobre la infección de *Salmonella enteritidis* en pollos de engorda (tesis). México (D.F.): Univ. Nal. Aut. de Mex., 1994.
- 23.- Wakelin D, Elaine MR. Immunity to coccidiosis. In: Long PL, editor. Coccidiosis of Man and Domestic Animals: CRC Presss, 1990:281-301.

24.- Wigley CB. The cell culture laboratory. In: Davis JM editor. Basic cell culture a practical approach. IRL Press, 1994: 1-26.

25.- Zhang J, Wilson E, Yang S, Healy MC. Increasing the Yield of *Eimeria tenella* oocysts in primary chicken kidney cells. Avian Disc 1996; 40:63-67.

26.- Zhang J, Wilson E, Yang S, Healy MC. Adapting *Eimeria tenella* to grow in primary chicken kidney cells following repeated passages between cell culture and chickens. Avian Disc. 1997, 41:111-116.