

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

7₂₅.

**DETERMINACION DE INTERFERON GAMMA DURANTE LA
INFECCION EXPERIMENTAL CON *Eimeria tenella* EN POLLO
DE ENGORDA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:

A V E S

P R E S E N T A D A P O R :

MVZ MARCO ANTONIO JUAREZ ESTRADA

**ASESORES: MVZ MCV GARY GARCIA ESPINOSA
MVZ PhD GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ MC JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ
DVM TAMAS FEHERVARI**



MEXICO, D. F.

MAYO DE 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

26 2029



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

MVZ Marco Antonio Juárez Estrada

DEDICATORIA

A mi padre:

Dr. Heriberto Elias Juárez Brito

IN MEMORIAM

Por ser todo lo que eres, vale; la obra del hombre continua...

A mi hermano : Lalo

A mi tío: Alfonso

IN MEMORIAM

A mi madre:

Delia Estrada Garduño

Por que los caminos del amor maternal son inescrutables...

A mis hermanos:

Claudia Isabel, Alejandro, Elías y Delia

Martha Dinorah, Adriana Elizabeth y José Ariel

A mi tía tere

A mis primas Margarita y Etelvina

Por siempre incondicional, mi familia...

e pluribus unum...

AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad Nacional Autónoma de México
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Al Departamento de Producción Animal: Aves**

A la Dirección General de Personal Académico (DGAPA-UNAM)
Por el apoyo de la beca otorgada para la realización de los presentes estudios de maestría

**A la Secretaría de Investigación de la División de Estudios de Posgrado e Investigación
de la FMVZ-UNAM**

Por el apoyo otorgado para la realización de la presente investigación de tesis de maestría

A mis asesores y sinodales, especialmente al Dr. Francisco Suárez Güemes y al Dr. José Antonio Montaña Hirose. Por compartir su tiempo y conocimientos en el mejoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Guillermo Téllez. Por confiar en mí y darme todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

A mis amigos Víctor Petrone, Alejandro Méndez, Chucho Cabriales, Araceli Mendoza, Gerardo Nava, Julio C. Alfaro, Xóchitl Hernández y Ruben Merino. Sin ustedes nunca hubiera hecho esto y lo más importante: más que un equipo son mis amigos.

A mis compañeros del DPA: Aves. Juanito Merino, Libia Yardania, Ivonne González, Eva Hernández, Adelfo Juárez, Juan Carlos del Río, Teresa Casaubon, Nestor Ledesma, Miguel Cenicerós, Maricela Frago, Daniel Ortega, Consuelo Figueroa, Pilar Castañeda, Daniel Camacho, Roberto Santiago, Alberto Delgado, Alejandro Banda, Reynaldo Moreno, Alejandro Hernández, Humberto, Norma Calderon, Lilia Castellanos, Monica Andrade, Luz M. Charles, Carlos López Coello, Ernesto Ávila, Ezequiel, Benjamín, Mauro, Javier Balcázar, Larissa, Liz, Judith, Felipa, Eva Faride, Maria Elena Rubio, Elizabeth Abrego, Cecilia Rosario, Blanca Bautista, Gabriela Gómez, Edmundo, Magdalena Escorcía, Manuel Quiroz, Rodrigo Merino, Arturo Cortés, Tomás Jines, Bernardo Parra, Memo Zavala, Omar, Lillian Meede, Edgar, Mireya, Pancho, José María, Vicky, José, Rosy, Laura, Avril, Ileana, Rosaura, Odette. Por que además de compartir conmigo su ayuda, tiempo y espacio comparten conmigo lo más importante: su amistad. **Allis vivere...**

A todas las personas que de alguna manera participaron o contribuyeron en la elaboración de este trabajo. **Un MILLON DE GRACIAS.....**

RESUMEN

(Determinación de interferón gamma durante la infección experimental con *Eimeria tenella* en pollo de engorda. Asesorado por MVZ MC Gary García E., MVZ PhD Guillermo Télles I., MVZ MC José Antonio Quintana L. y DVM Tamás Féhérvári). Con la finalidad de evaluar el interferón (IFN) secretado durante la infección experimental con *Eimeria tenella* se realizaron cuatro estudios. En el primero se evaluó la respuesta primaria en linfocitos T (LT) esplénicos de pollo de engorda (Hubbard x Hubbard) de 20 días de edad desafiados con 1×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Los LT se aislaron a partir de cuatro bazos en una mezcla celular con la técnica de columnas de fibra de nilón al día 1, 3, 5, 7 y 9. En el segundo experimento también de respuesta primaria, el aislamiento se efectuó con la técnica de ficoll hypaque con cultivos celulares esplénicos individuales. En el tercer experimento 32 aves fueron desafiadas previamente con una dosis única de 1×10^4 ooquistes al día 20 de edad, 14 días después se desafiaron con 5×10^4 ooquistes de la misma cepa, 16 aves testigo no se desafiaron. En el cuarto experimento 32 aves tuvieron un programa de inmunización con 1000 ooquistes diarios durante 10 días hasta el día 20 de edad, 10 días después se desafiaron con 5×10^4 ooquistes de la misma cepa. En los experimentos de respuesta secundaria al día 1, 3, 7 y 9 postinoculación (PI) se sacrificaron ocho aves del grupo tratado y cuatro del testigo. Los bazos se juntaron en dos mezclas celulares del grupo desafiado y una del testigo. Los LT del tercer y cuarto experimento se purificaron con columnas de fibra de nilón. Para evidenciar el IFN presente cada día PI se empleó un ensayo antiviral con el virus de la enfermedad de Newcastle, la infección de la bolsa de Fabricio y la estomatitis vesicular. El grado de infección en cada modelo se determinó por calificación de lesiones y cuantificación de ooquistes. En el primer experimento se observó que el IFN del grupo desafiado alcanza un pico al día 5 PI diferente ($p < 0.05$) al grupo testigo, baja ligeramente al día 7 PI ($p < 0.05$) y se incrementa al día 9 PI ($p < 0.05$). En el segundo experimento se determinó un comportamiento similar al primero. En el tercer experimento a los días 1 y 3 PI en el grupo desafiado se observó un nivel alto de IFN el cual disminuyó al día 7 y 9 PI ($p < 0.05$). En el cuarto experimento en el grupo desafiado se determinaron niveles altos de IFN al día 1 y 3 PI, al día 7 y 9 PI estos niveles bajaron. Se observó un aumento de ooquistes y del grado de lesiones ($p < 0.05$) en las aves de la respuesta primaria en comparación a las aves de la respuesta secundaria, lo que coincidió con el grado de inmunidad adquirido. Es factible que el pico de IFN observado al día 5 PI en la respuesta primaria este relacionado con el grado de resistencia de las aves y su eficacia en el establecimiento de inmunidad celular. El alto nivel de IFN observado al inicio de la respuesta secundaria posiblemente sea un reflejo de la estimulación antigénica constante y probablemente se debe a la existencia previa de subpoblaciones de LT inmunes contra *E. tenella*.

Palabras clave: pollo de engorda; interferón; linfocitos T; inmunidad celular; coccidiosis aviar; *Eimeria tenella*; virus de la enfermedad de Newcastle; virus de la infección de la bolsa de Fabricio; virus de la estomatitis vesicular.

DETERMINATION OF INTERFERON GAMMA DURING EXPERIMENTAL INFECTION WITH
Eimeria tenella IN BROILERS.

SUMMARY

Four studies were carried out to evaluate the secretion of interferon (IFN) during experimental infection with *Eimeria tenella*. In the first study, the primary response of splenic lymphocytes T (LT) was evaluated in 20 days old broiler chickens (Hubbard x Hubbard) challenged with *E. tenella* sporulated oocysts 1×10^4 . Nylon wool columns were used to isolate LT in pools of four spleens at 1, 3, 5, 7 and 9 post-infestation (PI) days. In the second experiment, the primary response was also evaluated in LT isolated from individual spleens using ficoll hypaque gradients. In the third experiment, a group of 32 chicks aged of 20 days, were challenged first with 1×10^4 oocysts and 14 days later with 5×10^4 oocysts again, meanwhile 16 birds served as control, without any coccidia infestation. In the fourth experiment, 32 ten-day old chicks were submitted to a daily boosting program with 1000 oocysts/day during a period of 10 days and after another ten-day period they were challenged with 5×10^4 oocysts of the same *Eimeria* strain. In the studies of secondary immune response, eight birds from the challenged group and four from the control group were euthanased at 1, 3, 7 and 9 PI days. Two pools of spleen were separately prepared from challenged and control bird. Nylon wool columns were used to purify splenic LT and the supernatants were collected. In order to detect the presence of IFN, the viruses of Newcastle disease, infectious bursal disease and vesicular stomatitis were applied in antiviral assays. Lesion score and oocyst quantification methods were used to determine the severity of infection in each experiment. It was observed in the first experiment that the presence of IFN in challenged group reached a peak on the 5th PI day, different from the control group, slightly decreased on the 7th PI day and increased it on the 9th PI day again (always $p < 0.05$). The result of the second experiment resembled to the first one. On the 1st and 3rd PI days of the third trial, a high level of IFN was observed in the challenged group, which lowered at the 7th and 9th PI days ($p < 0.05$). A high level of IFN was also detected in the fourth experiment between 1st and 3rd PI days; this level decreased between the 7th and 9th PI days. More and severer lesions and increased number of oocysts ($p < 0.05$) were observed in the primary response group than the secondary one, cases which coincided to the immunity degree. The peak of IFN observed on 5th PI day in the primary response group (challenged group) were likely relationed to resistance degree of the birds and their cellular immunity efficacy. In the challenged group, the high level of IFN observed in the beginning of secondary response, is likely due to the previous antigenic stimulation from immune subset LT against *E. tenella*.

Key words: chicken; birds; broiler; interferon; T lymphocytes; cellular immunity; avian coccidiosis; *Eimeria tenella*; boosting; Newcastle disease; infectious bursal disease; vesicular stomatitis.

INDICE

		Página
Capítulo 1.0	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Coccidiosis aviar	1
1.2	Repercusiones de la coccidiosis provocada por <i>Eimeria tenella</i>.....	1
1.3	Control farmacológico	2
1.4	Nuevas estrategias para su control	2
1.5	Perspectivas inmunológicas de la vacunación	3
1.6	Proceso inflamatorio e inmunidad celular	4
1.6.1	Las citocinas en el proceso de inmunorregulación inflamatoria.....	4
1.7	Interacción inmunológica intestinal	6
1.8	Importancia de los linfocitos T en la infección por <i>Eimeria tenella</i>.....	7
1.8.1	Inmunorregulación de los LT CD8+ en la infección por <i>Eimeria tenella</i>.....	8
1.8.2	Los LT con función NK en el contexto de la resistencia a la coccidiosis.....	10
1.9	Importancia del estudio de las citocinas en la infección por <i>Eimeria tenella</i>.....	10
1.9.1	LT involucrados en la cascada de las citocinas	11
1.10	El interferón γ en ensayos de inmunoprofilaxis	11
1.10.1	Mecanismos de acción del interferón γ	13
1.10.2	El interferón γ como inmunorregulador	15
1.10.3	Importancia del interferón γ.....	15
1.11	Objetivos	19
Capítulo 2.0	MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1	Inóculo parasitario	20

	Página	
2.1.1	Obtención del inóculo de <i>Eimeria tenella</i>	20
2.1.2	Purificación del inóculo de <i>Eimeria tenella</i>	20
2.2	Inóculo viral	21
2.2.1	Obtención y preparación de los inóculos virales	21
2.3	Cultivos celulares	21
2.3.1	Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo	21
2.3.2	Cultivos celulares de línea	22
2.4	Cultivo de linfocitos T	23
2.4.1	Obtención de los sobrenadantes (SN) con la técnica de columnas de fibra de nilón.....	23
2.4.2	Obtención de los sobrenadantes (SN) a través de la técnica de gradientes discontinuos de ficoll hypaque.....	24
2.5	Preparación de las citocinas	25
2.6	Administración de las citocinas a las placas	25
2.7	Administración del virus a las placas	26
2.8	Ensayo antiviral	26
2.8.1	Utilización de un ensayo antiviral con la finalidad de evaluar el contenido de interferón de cada uno de los sobrenadantes.....	26
2.8.2	Evaluación del ensayo antiviral	27
2.9	Animales de experimentación para la obtención de los Sobrenadantes.....	28
2.9.1	Primer y segundo estudio experimental	28
2.9.2	Tercer y cuarto estudio experimental	28
2.10	Diseño experimental	29
2.10.1	Primer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria).....	29
2.10.2	Segundo estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria).....	30
2.10.3	Tercer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria).....	31

	Página
2.10.4	Cuarto estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)..... 31
2.11	Evaluación de los estudios experimentales 32
2.12	Análisis estadístico 33
Capítulo 3.0	RESULTADOS 35
3.1	Primer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)..... 35
3.2	Segundo estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)..... 36
3.3	Tercer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)..... 37
3.4	Cuarto estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)..... 38
Capítulo 4.0	DISCUSIÓN 41
Capítulo 5.0	LITERATURA CITADA 59
Capítulo 6.0	CUADROS Y FIGURAS 76

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de ooquiste esporulado de <i>Eimeria tenella</i> y esquema del ciclo reproductivo de <i>Eimeria tenella</i> .	76
Figura 2. Mecanismos de acción del interferón γ .	77
Figura 3. Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en columnas de fibra de nilón provenientes de una infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> en pollo de engorda.	78
Figura 4. Comparación entre los ensayos antivirales empleados en la determinación del interferón producido por linfocitos purificados en columnas de fibra de nilón durante la primoinfección con <i>Eimeria tenella</i> .	79
Figura 5. Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en gradientes de ficoll hypaque durante una infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> en pollo de engorda.	80
Figura 6. Comparación entre los ensayos antivirales empleados en determinar el interferón producido por linfocitos purificados en gradientes de ficoll hypaque durante la infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> .	81
Figura 7. Comparación de interferón determinado con el mismo ensayo antiviral en linfocitos aislados en columnas de fibra de nilón o en gradientes de ficoll hypaque durante la infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> .	82
Figura 8. Producción de interferón por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria de <i>Eimeria tenella</i> en pollo de engorda.	83

Figura 9. Comparación entre los ensayos antivirales empleados en la determinación del interferón producido por linfocitos esplénicos durante la infección secundaria con <i>Eimeria tenella</i> con una única inmunización previa.	84
Figura 10. Producción de interferón por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria de <i>Eimeria tenella</i> en pollos de engorda previamente inmunizados (programa de refuerzo).	85
Figura 11. Comparación entre los ensayos antivirales utilizados en la determinación de interferón producido por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria con <i>Eimeria tenella</i> (programa de refuerzo).	86
Figura 12. Determinación de ooquistes de <i>Eimeria tenella</i> en ciego con la cámara de Neubauer en tres diferentes modelos de infección.	87
Figura 13. Determinación de ooquistes de <i>Eimeria tenella</i> en heces con la cámara de McMaster a partir de tres diferentes modelos de infección.	88
Figura 14. Severidad de lesiones cecales en pollos infectados con <i>Eimeria tenella</i> en tres distintos modelos de infección.	89

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Comparación de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos aislados con columnas de fibra de nilón en dos ensayos antivirales a los 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> .	90
Cuadro 2. Respuesta de la protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos aislados con gradientes de ficoll hypaque a los 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección primaria con <i>Eimeria tenella</i> .	91
Cuadro 3. Comparación de la respuesta de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos en dos ensayos antivirales a los 1, 3, 7 y 9 días después de la infección secundaria con <i>Eimeria tenella</i> .	92
Cuadro 4. Respuesta de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos de pollo de engorda previamente inmunizados con <i>Eimeria tenella</i> a los 1, 3, 7 y 9 días después de una infección secundaria.	93
Cuadro 5. Conteo comparativo de la cantidad de ooquistes con la cámara de Neubauer en ciegos de aves infectadas experimentalmente con <i>Eimeria tenella</i> al día 5, 7 y 9 postinoculación, en tres diferentes modelos de infección.	94
Cuadro 6. Conteo comparativo de ooquistes en heces con la cámara de McMaster al día 7 después de la inoculación con <i>Eimeria tenella</i> en tres diferentes modelos de infección.	95

ABREVIATURAS

ANDEVA = Análisis de varianza

AcM = Anticuerpos monoclonales

B₂m = B₂ microglobulina

CD4 + = Linfocitos T con marcador específico de membrana *cluster determinant* 4 +

CD8 + = Linfocitos T con marcador específico de membrana *cluster determinant* 8 +

CF = Citometría de flujo

Cs-A = Ciclosporina A

Con-A = Concanavalina-A

CPA = Célula presentadora de antígenos

CPE = Efecto citopático

DICC = Dosis infectante cultivo celular

DPA: Aves = Departamento de Producción Animal: Aves

ET-ILK = Sobrenadante de linfocinas de aves hiperinmunes contra *Eimeria tenella*

GALT = Tejido linfoide asociado al intestino

GM-CSF = Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

g = gramo

g = gravedad

h = hora

IFN-gamma = Interferón gamma

IFN-γ = Interferón gamma

IL-1 = Interleucina 1

IL-2 = Interleucina 2

IL-3 = Interleucina 3

IL-4 = Interleucina 4

IL-5 = Interleucina 5

IL-6 = Interleucina 6

IL-8 = Interleucina 8

IL-10 = Interleucina 10

IL-12 = Interleucina 12

IL-1Ra = Antagonista receptor de la interleucina 1

UI = Unidades internacionales

LPE = Libre de patógenos específicos
LB = Linfocitos B
LT = Linfocitos T
Log 2 = Logaritmo base 2
Mor-80 = Cepa específica de *Eimeria tenella*
MDBK = Línea celular a partir de células de riñón de bovino (Madin Darby)
MHC = Complejo principal de histocompatibilidad
MEM = Medio esencial mínimo
NK = Células asesinas naturales
NILK = Linfocinas provenientes de aves no inmunes
Nunc-96 = Placa de cultivo celular de 96 pozos planos
PMN = Leucocitos polimorfonucleares
P-E = Penicilina-Estreptomicina
PC = Proteína cruda
PHA = Fitohemaglutinina
PI = Postinoculación
SE-ILK = Sobrenadante de linfocinas de aves hiperinmunes contra *Salmonella enteritidis*
SG-ILK = Sobrenadante de linfocinas de aves hiperinmunes contra *Salmonella gallinarum*
SFB = Suero fetal bovino
SN = Sobrenadante
TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β = Factor de necrosis tumoral beta
TCR = Receptor en membrana de linfocitos T
TCR $\gamma \delta$ = Receptor específico de linfocitos T $\gamma \delta$ tipo I
TCR $\alpha \beta$ = Receptor específico de linfocitos T $\alpha \beta$ tipo II
Th1 = Perfil de secreción de linfocinas específicas de LT CD4 +
Th2 = Perfil de secreción de linfocinas específicas de LT CD4 +
TGF = Factor de crecimiento transformador
UI = Unidades internacionales
U = Unidades
VIBF = Virus de la infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro)
VENC = Virus de la enfermedad de Newcastle
VEV = Virus de la estomatitis vesicular

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Coccidiosis aviar

La coccidiosis aviar es sin duda la enfermedad parasitaria que mayor importancia tiene, debido a que ocasiona grandes pérdidas económicas en la producción avícola mundial.

Es producida por un protozooario que incluye a diversas especies del género *Eimeria*. Se caracteriza por ser un parásito intracelular obligado especie-específico con ciclo de vida autolimitante (Figura 1, Esquema 2) (McDougal y Reid, 1991; Moreno, 1989).

Afecta el tejido intestinal lo que se refleja con pérdida de peso, retraso en el crecimiento, baja conversión alimenticia, despigmentación, susceptibilidad a otros patógenos infecciosos y mortalidad. Las aves más afectadas son animales jóvenes entre 4 y 6 semanas de vida (McDougal y Reid, 1991; Moreno, 1989; Rose, 1989; Wakelin y Rose, 1991). En México, *Eimeria tenella* y *E. acervulina* son las especies de coccidia de mayor prevalencia en el pollo de engorda, un solo ooquiste esporulado es capaz de reproducirse potencialmente en millones de ooquistes que llegan a producir gran daño en aves susceptibles (Figura 1, Esquema 1) (Moreno, 1989; Moreno *et al*, 1980).

1.2 Repercusiones de la coccidiosis provocada por *Eimeria tenella*

En México, la especie de coccidia más problemática es *E. tenella*, que provoca los problemas más severos en las granjas. Se caracteriza por causar lesiones en ciegos, pérdida de peso y retraso en el crecimiento (Moreno, 1989; Moreno *et al*, 1980). Esto se ve favorecido por la alta patogenicidad de la cepa involucrada, su poca inmunogenicidad y la susceptibilidad del pollo, siendo un problema constante en la industria del pollo de engorda (Bafundo, 1994; Long *et al*, 1986; Nakai *et al*, 1992; Stiff y Bafundo, 1993).

El tipo de coccidiosis clínica o subclínica depende del número de ooquistes ingeridos y del grado de patogenicidad de la cepa involucrada, en la coccidiosis clínica hay mortalidad de hasta el 15%. Sin embargo, la presentación subclínica es la más importante ya que favorece un estado de tensión e inmunodepresión constante muchas veces acompañado de un brote clínico con todas sus repercusiones (McDougal y Reid, 1991; Moreno *et al*, 1980).

1.3 Control farmacológico

Para obtener su control, desde fines de la década de 1940 se han implementado programas terapéuticos a base de fármacos de fermentación microbiológica y síntesis química. Sin embargo los anticoccidianos de ambos grupos poseen algunas de las siguientes restricciones:

- a).- No existe ningún fármaco que elimine a todas las especies de coccidia existentes en el pollo.
- b).- Algunos de los fármacos producen efectos colaterales indeseables.
- c).- Se ha observado que algunas cepas de coccidia han desarrollado resistencia a fármacos específicos.

Esta problemática ha orientado a la elaboración de diferentes estrategias en su utilización, como son los programas duales, la rotación y la mezcla de anticoccidianos con principios activos diferentes. Sin embargo estas estrategias no han resultado ser siempre eficaces (Bafundo y Jeffers, 1990; Chapman, 1984(a,b); Eckman, 1993; Jeffers y Bentley, 1980; McDougal, 1994; McDougal y Reid, 1991).

1.4 Nuevas estrategias para su control

Actualmente debido a un límite en la utilización de las drogas anticoccidiales, con la finalidad de establecer una inmunidad adecuada en las aves se ha propuesto la aplicación de vacunas vivas con base a coccidias de periodos de prepatencia precoz, atenuadas o modificadas para emplearse en gallinas reproductoras y pollonas de postura para reemplazo (Moreno, 1984,1985). Sin embargo obtener resultados favorables no es tan simple, ya que se desconocen en forma precisa cuáles son las bases inmunológicas celulares implicadas en la protección y se desconocen exactamente los mecanismos patogénicos del parásito durante la infección. Además las vacunas con base a coccidias vivas tienen algunas limitantes, ya que se requiere experiencia técnica en su aplicación (Bafundo, 1994; Moreno, 1985).

En el pollo de engorda la más ligera infección vacunal afecta los parámetros productivos. Existe además el riesgo de introducir a la granja nuevas cepas potencialmente patógenas que propician la presentación de brotes clínicos. Además según el tipo de cepas contenidas en la vacuna se corre el riesgo de que las aves se encuentren susceptibles contra otra especie de *Eimeria*, debido a que no existe inmunidad cruzada entre las mismas e incluso entre cepas de una misma especie (Bafundo, 1994; Moreno, 1984, 1985;).

1.5 Perspectivas inmunológicas de la vacunación

La mayoría de las investigaciones actuales se enfocan a descubrir cuáles son los principales factores involucrados en la patogenicidad de la coccidia hacia su huésped y los mecanismos inmunológicos que emplea el ave para obtener una inmunidad eficaz (Bafundo, 1994; Jenkins *et al*, 1991; Jeurissen *et al*, 1996; Lillehoj and Trout, 1993). La investigación se ha enfocado además, a la caracterización de antígenos recombinantes de *Eimeria spp* que puedan ser utilizados como vacunas (Lillehoj y Trout, 1993; Witter *et al*, 1994) y de citocinas recombinantes que potencialicen la respuesta inmune (Leong *et al*, 1994).

En estudios *in vivo* se ha observado que para inducir una respuesta inmune eficaz que sea capaz de proteger ante un desafío posterior con altas dosis de ooquistes se necesitan dosis bajas y repetidas de *E. tenella* o *E. acervulina* (Joiner y Norton, 1976; Long *et al*, 1986; Nakai *et al*, 1992; Stiff y Bafundo, 1993).

Otros estudios han mostrado que la respuesta humoral se halla implicada en la protección inmune, sin embargo no es suficiente para brindar una protección eficaz (Ovington *et al*, 1995; Talebi y Mulcahy, 1995(a)). Las respuestas inmunológicas a este tipo de parásitos son complejas e involucran los dos tipos de inmunidad específica: la humoral y la celular (Dunnigton *et al*, 1992; Rose y Wakelin, 1989; Wakelin y Rose, 1991).

Se han realizado estudios con aves bursectomizadas que muestran un desarrollo inmune normal a las coccidias, lo que no sucedió en aves timectomizadas que tuvieron lesiones severas ocasionadas por las coccidias, lo que indica un papel de mayor importancia para los LT que para los B (Pierce and Long, 1965). Además *in vitro* se ha observado que la proliferación de LT se ve aumentada en respuesta a la infección con diferentes antígenos coccidianos de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. máxima* (Lillehoj, 1986; Martin *et al*, 1995; Prowse y Pallister, 1989; Rothwell *et al*, 1995), lo que indica la importancia de la protección de los LT contra las coccidias y de los mecanismos que puede inducir una vacuna de coccidia en ellos.

No se conoce precisamente el mecanismo celular de protección contra las distintas especies de *Eimeria*, por lo que se requiere investigar en distintas áreas del conocimiento sobre este mecanismo, para que ayude en el diseño de nuevas estrategias de control (Juárez *et al*, 1997(c); Lillehoj y Trout, 1993; Ovington *et al*, 1995; Witter *et al*, 1994).

1.6 Proceso inflamatorio e inmunidad celular

Al principio de una infección el antígeno (Ag) es reconocido por una célula presentadora de antígenos profesional (CPA) la cual lo procesa para presentarlo en el contexto de su molécula de superficie clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) al receptor de linfocitos T (TCR). Posteriormente entre las células se inicia una comunicación a través de receptores de membrana. Existe otro tipo de comunicación entre células especializadas por medio de mediadores solubles denominados citocinas y en el caso de los linfocitos se les conoce como linfocinas (Engelhard, 1994; Roitt *et al*, 1993).

La presencia del Ag propicia la liberación de citocinas e inicia una serie de eventos por parte del sistema inmunológico del huésped que involucra regular los procesos biológicos ligados a la inflamación y a la inmunidad (Delannoy *et al*, 1993). Las linfocinas son proteínas solubles de distintos pesos moleculares, sintetizadas por los LT o los linfocitos LB. La síntesis de linfocinas se efectúa bajo su propio patrón genético y no por células secundarias o por proteínas extracelulares complementarias (Paul, 1993).

Cada citocina posee una función específica que manifiesta al momento de adherirse a los receptores de su célula blanco (Abbas *et al*, 1994). La liberación de citocinas dependerá del tiempo que dure el estímulo, que puede estar dado por otras citocinas o a través de receptores de membrana como el MHC y el TCR. El tiempo de acción dependerá de la permanencia del Ag en el organismo para que a su vez éste mantenga activo al sistema inmune y continúe la presencia de citocinas en el medio extracelular (Abbas *et al*, 1994; Engelhard, 1994).

1.6.1 Las citocinas en el proceso de inmunorregulación inflamatoria

Las primeras citocinas que se secretan activan la diferenciación y proliferación de LT. Entre ellas se encuentra la IL-2 producida por LT CD4+ y CD8+ (Knudson *et al*, 1990). Interactúan a la vez citocinas quimiotácticas y vasoactivas como la IL-8, IL-1, TNF- α e IL-6 (Delannoy *et al*, 1993). La IL-4 es producida por LT CD4+ y es una inmunomoduladora importante. A su vez se liberan otras citocinas que van ayudar a inmunorregular la inflamación como el IFN- γ que es producido por LT CD4+, CD8+ y NK; la misma IL-2 y el TNF-B producido por LT activados (Klasing, 1994; Street *et al*, 1991).

Otras citocinas inhiben la síntesis de citocinas específicas y por lo tanto se consideran citocinas antiinflamatorias a la IL-10 producida por LT CD4+ cooperadores (Th2), el antagonista receptor de la IL-1 (IL-1Ra) y el factor transformante de crecimiento (TGF) (Delannoy *et al*, 1993).

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es liberado por los LT CD4+ estimula la diferenciación y proliferación de granulocitos y fagocitos mononucleares, contribuye además a la quimiotaxis de leucocitos al sitio de inflamación (Abbas *et al*, 1994; Paul, 1993).

Las linfocinas son particularmente importantes para combatir virus, parásitos y bacterias intracelulares (Shat, 1994). Los macrófagos actúan secretando citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, GM-CSF y TGF. El TNF- α activa LT CD4+, CD8+, LT CD4+Th1, LT CD4+Th2 y PMN (Petrone *et al*, 1997). La activación y secreción de IFN- γ por los LT CD4+ dirige la actividad de los macrófagos por lo cual juega un papel importante en la inmunidad y la resistencia (Breed *et al*, 1997; Paul, 1993; Street *et al*, 1991).

Por su parte los LT CD8+ secretan linfotoxinas, IFN- γ y en menor cantidad TNF- α . Poseen diferentes mecanismos para destruir patógenos al provocarles lisis después de la identificación de sus células blanco. Las citocinas tienen múltiples funciones y más de una citocina puede mediar la misma o varias funciones similares al mismo tiempo (Abbas *et al*, 1994; Klasing, 1994; Street *et al*, 1991).

Las citocinas IL-2, IL-3, IFN- γ y GM-CSF (Abbas *et al*, 1994) son liberadas principalmente por los linfocitos Th1 y cada una de ellas tiene funciones específicas al adherirse a su célula blanco. Por ejemplo la IL-2 estimula el crecimiento de los LT, LB, NK y la IL-3 estimula la diferenciación y proliferación de todos los tipos celulares. El IFN- γ activa a los macrófagos, linfocitos NK, células endoteliales, así como incrementa la expresión de moléculas del CMH clases I y II de todas las células. El IFN- γ es además inmunorregulador de citocinas y tiene actividad antiviral y antitumoral. Cuando se hallan presentes simultáneamente IFN- γ más TNF- α manifiestan un poderoso sinergismo y actividad citolítica (Byrnes *et al*, 1993(a); Dijkmans *et al*, 1989; Revel, 1979; Roitt *et al*, 1993; Paul, 1993; Street *et al*, 1991).

1.7 Interacción inmunológica intestinal

El tejido primario para la invasión de la coccidia es el epitelio intestinal, el conocimiento de la interacción entre LT y coccidias en el intestino es crucial para el diseño de una vacuna que sea efectiva. Sin embargo existe poca información disponible relacionada con el sistema inmune intestinal de las aves (en contraste a lo que ya se sabe del sistema inmune de los mamíferos).

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) de los pollos que incluye células inmunorreguladoras y efectoras, en diferentes condiciones experimentales ha resultado ser la primer línea de defensa a nivel de superficie de la mucosa intestinal (Cabriales, 1997; Lillehoj, 1996(a,b)).

En las aves, como en los mamíferos la identificación de antígenos de superficie con AcM hizo posible la distinción entre LT cooperadores (marcador CD4+) y LT efectores (marcador CD8+), sin embargo estos antígenos de superficie no son indicadores absolutos de una sola función (Abbas *et al*, 1994), los dos tipos de LT varían en sus funciones. Los LT CD4+ auxilian en la inmunomodulación de subpoblaciones celulares, síntesis de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad, mientras que los LT CD8+ regulan principalmente efectos citotóxicos (Shat, 1994). Los LT CD8+ reconocen antígenos extraños aunados a moléculas clase I del MHC, mientras que los LT CD4+ reconocen antígenos extraños en asociación estrecha con moléculas clase II del MHC (Abbas *et al*, 1994; Shat, 1994).

La ontogenia de los LT en el intestino del ave se ha determinado durante las primeras semanas de vida. Los LT CD8+ se han observado en número creciente como linfocitos intraepiteliales (IEL) y en lámina propia intestinal (LPI) hasta las ocho semanas de edad, posteriormente empiezan a disminuir. Los LT CD4+ se han hallado únicamente en LPI y su número es menor en relación al de los LT CD8+ (Lillehoj y Chung, 1992).

El aumentar el conocimiento sobre el papel que juega el sistema inmune intestinal del ave contra la infección por coccidias, contribuirá a diseñar nuevos esquemas de vacunación contra la coccidiosis que sean efectivos y no manifiesten los efectos detrimentales que se han observado.

1.8 Importancia de los linfocitos T en la infección por *Eimeria tenella*

La importancia de los LT en la respuesta inmune a las coccidias esta bien documentada (Lillehoj and Trout, 1993). Por ejemplo, en ratones se ha determinado que la inmunidad conferida por células esplénicas y de linfonódulos provenientes de ratones inmunes a *Eimeria falciformis* puede ser transferida a ratones susceptibles los cuales resisten adecuadamente un desafío. En un ensayo *in vivo* una depleción parcial de LT inducida por un anticuerpo monoclonal (AcM) contra el antígeno Thy 1.2 produce un abatimiento casi total de la inmunidad protectora contra *E. falciformis* y alarga el periodo de patencia (Rose *et al*, 1992). En animales atímicos se ha observado que la reacción a la infección primaria por coccidias es más severa que en animales normales, además de no crear resistencia ante una reinfección (Ovington *et al*, 1995).

Los resultados de otros estudios indican que la depleción *in vivo* de LT CD4+, incrementa la severidad de la infección primaria por *E. vermiformis*, pero no tiene efecto alguno cuando la inmunidad ya se encuentra establecida (Rose *et al*, 1989, 1991(b)). Sin embargo, cuando se induce la depleción *in vitro* de LT CD4+ pero no la de LT CD8+ colectados de ratones inmunes se impide la transferencia de inmunidad a ratones receptores susceptibles, lo que sugiere un papel importante de los LT CD4+ en la inducción de inmunidad a las infecciones por *E. vermiformis* (Rose *et al*, 1992, 1991(a))

En aves inmunes a *Eimeria spp* se ha observado que las células esplénicas y linfocitos sanguíneos son capaces de transferir resistencia a aves no inmunes (Rose *et al*, 1979; Rose y Hesketh, 1982).

El papel de los LT en la resistencia a la coccidiosis ha sido investigada con agentes que suprimen las respuestas inmunes mediadas por células, como la ciclosporina A (Cs-A), betametasona y dexametasona (Isobe y Lillehoj, 1993; Kogut y Slajchert, 1992; Lillehoj, 1987). Cuando la Cs-A se proporcionó junto con los ooquistes, la infección se redujo, posiblemente por su efecto sobre los ooquistes; sin embargo, cuando se proporcionó antes del desafío con los ooquistes, la susceptibilidad a la infección aumentó y cuando se dio antes de un desafío secundario la inmunidad se abatió (Isobe y Lillehoj, 1993).

Lillehoj (1987) proporcionó Cs-A a aves antes de infectarlas con tres *Eimerias spp* de pavo la inmunosupresión inducida por la Cs-A permitió que éstas completaran su ciclo de vida. Los resultados fueron similares cuando se empleó betametasona y dexametasona, además se observó que las respuestas de IgG e IgA específicos a la *Eimeria* utilizada en el

desafío aumentaron. Estos resultados sugieren una participación importante de los LT en la inmunorregulación de la resistencia natural contra *Eimeria spp* de diferentes especies de huésped.

Martin y colaboradores (1993,1995) observaron que algunos antígenos solubles provenientes de diferentes estadios de *E. tenella*, *E. maxima* o *E. acervulina*, fueron capaces de inducir *in vitro* la proliferación específica de LT obtenidos de aves previamente inmunizadas contra la especie específica utilizada. Sin embargo, se observó que *E. acervulina* induce poca o nula proliferación de LT provenientes de aves inmunizadas contra *E. tenella*, por lo cual concluyen que la naturaleza de las respuestas inmunes a *Eimeria spp* son especie-específicas por parte del huésped, lo cual concuerda con lo reportado por Lillehoj y colaboradores (1989). Sin embargo, en algunos estudios recientes se ha reportado que los LT de aves inmunes a *E. tenella* responden a la estimulación con factores solubles de *E. acervulina* siempre y cuando se utilicen grandes concentraciones de este antígeno, y viceversa, sucede lo mismo si se estimulan LT de aves inmunes a *E. acervulina* con antígenos solubles de *E. tenella* o de *E. acervulina* respondiendo favorablemente a ambos antígenos (Kaspers *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989).

Estos reportes sugieren que las respuestas cruzadas mediadas por los LT se pueden inducir bajo determinadas circunstancias. Sin embargo, si realmente existe ésta reactividad cruzada de los LT con epítomos específicos, la respuesta de por qué esto no se observa *in vivo* permanece aún sin esclarecer (Juárez *et al*, 1997(c)).

1.8.1 Inmunorregulación de los LT CD8+ en la infección por *Eimeria tenella*

La respuesta inmune inducida por las infecciones coccidiales involucra tanto la resistencia como la inmunidad. La resistencia es responsable de la eliminación de parásitos durante las fases tempranas de una infección primaria, mientras que la inmunidad a *Eimeria spp* usualmente se considera en el contexto de una infección secundaria, que resulta en la reducción del número de ooquistes eliminados, así como en la atenuación de la signología clínica (Abbas, 1994; Rose *et al*, 1984; Sharma,1991).

En huéspedes inmunes, los esporozoitos que entran al intestino un poco después de la inoculación, se ven impedidos para completar su desarrollo; cuando estos esporozoitos son removidos 24-48 horas post-inoculación y se inoculan en un huésped susceptible, completan su desarrollo y se observa un efecto patogénico (Rose y Hesketh,1992).

La inmunidad a la coccidiosis involucra mecanismos que a la vez que ayudan a reducir el número de esporozoitos intracelulares inhiben el desarrollo natural del parásito.

Aunque no se ha demostrado la participación directa de los LT CD8+ en la resistencia a la coccidiosis, un incremento en el número de estas células ha sido observado en el epitelio del intestino después de una infección secundaria (Lillehoj y Bacon, 1991; Rothwell *et al*, 1995; Trout y Lillehoj, 1995, 1996; Vervelde *et al*, 1996).

Los LT CD8+ se han observado frecuentemente en contacto directo con células epiteliales infectadas con el parásito, se ha sugerido que estas células epiteliales infectadas son un blanco para los LT citotóxicos en el contexto adecuado para el MHC clase I (Juárez *et al*, 1997(c); Lillehoj y Bacon, 1991; Trout y Lillehoj, 1993; Vervelde *et al*, 1996).

En ratones, una depleción selectiva de los LT CD8+ *in vivo* da como resultado un ligero incremento en la producción de ooquistes después de una infección secundaria con *E. vermiformis*, pero no tiene ningún efecto si la depleción se efectúa durante la infección primaria. La misma depleción de LT CD8+ incrementa la producción de ooquistes después de la infección secundaria con *E. pragensis*, con ligero decremento de la cantidad de ooquistes después de la infección primaria (Rose *et al*, 1992) factiblemente explicada por el papel que tienen los LT CD8+ en el aumento de invasibilidad de los esporozoitos de *Eimeria spp* al tejido intestinal, ya que se ha observado una invasión activa de los esporozoitos a los LT CD8+ (Juárez *et al*, 1997(a); Lawn y Rose, 1982; Trout y Lillehoj, 1995).

Trout y Lillehoj (1995) han observado resultados similares en aves con depleción de LT CD8+ después de la infección primaria y secundaria con *E. acervulina*. La depleción de LT CD8+ incrementa la severidad de una infección secundaria al haber ausencia de células citotóxicas que en condiciones normales eliminan a las células infectadas y así limitan la multiplicación del parásito. Esta observación junto con los hallazgos histológicos, proveen evidencias de que los LT CD8+ intervienen en la inmunidad del huésped contra los parásitos coccidianos en las aves (Lillehoj, 1996(a); Rothwell *et al*, 1995; Vervelde *et al*, 1996). Por lo que es importante contar con técnicas de aislamiento celular adecuadas que garanticen un alto porcentaje de participación de estas células en los ensayos experimentales con *Eimeria spp*.

1.8.2 Los LT con función NK en el contexto de la resistencia a la coccidiosis

La resistencia responsable de la eliminación de parásitos, involucra componentes como los linfocitos NK y los macrófagos (Abbas, 1994). En años recientes se ha despertado un interés considerable por la población linfoide de la mucosa intestinal, particularmente en los linfocitos NK intraepiteliales. Se ha postulado que los linfocitos NK juegan un papel importante como mecanismo de defensa del huésped contra tumores, bacterias y virus, así como también en la homeocinesis de los tejidos normales. El epitelio intestinal de los pollos contiene células análogas a la actividad observada en los linfocitos NK de los mamíferos.

Se ha observado una correlación positiva entre la actividad de los linfocitos NK y la resistencia natural contra la coccidiosis (Lillehoj, 1996(a)). El incremento de actividad de los linfocitos NK ocurre en los estadios tempranos de la infección con coccidia y es más alto de lo normal cuando coincide con la eliminación del parásito, lo que sugiere un papel importante para los linfocitos NK en el control de la proliferación parasitaria y las consecuencias de la infección (Lillehoj y Trout, 1996).

1.9 Importancia del estudio de las citocinas en la infección por *Eimeria tenella*

En el humano y el ratón se han descubierto y caracterizado varias linfocinas como: IL-2, IL-3, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α y TNF- β entre otras (Abbas *et al*, 1994; Delannoy *et al*, 1993; Dijkmans *et al*, 1989; Klasing, 1994).

Sin embargo en medicina veterinaria sólo se han caracterizado IL-8 e IL-2 en bovinos (Sambhara y Belden, 1988), IL-2 en felinos (Bauer y Olsen, 1988) e IL-2 en aves (Myers *et al*, 1992). Recientemente en forma parcial se identificó IL-2 e IFN- γ de pollo (análogo en función al IFN- γ de mamíferos) en SE-ILK y SG-ILK obtenidos de LT provenientes de aves inmunizadas contra estas dos bacterias y estimuladas a una dosis de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de Con-A (Gómez, 1995).

Las respuestas inmunes a nivel de mucosa y la homeocinesis de las células epiteliales son reguladas por un amplio arsenal de citocinas; sin embargo, en aves se conoce poco de ellas y del papel que juegan en la protección contra *E. tenella*, por lo cual es necesario desarrollar líneas de investigación sobre las subpoblaciones de LT CD4+ de aves y sus patrones de secreción de linfocinas específicos. Se necesita específicamente efectuar estudios precisos a nivel del intestino que es el lugar donde la infección ocurre. Que involucren a su

vez análisis de citocinas tan importantes como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 (Juárez *et al*, 1997(c)).

1.9.1 LT involucrados en la cascada de las citocinas

Estudios recientes sobre protozoarios y bacterias intracelulares sugieren un papel importante para los LT CD4+ y LT CD8+, no sólo como células efectoras sino también como productoras de linfocinas que regulan la respuesta de otras células (Barcinski *et al*, 1994; Lillehoj y Trout, 1993; Téllez *et al*, 1993).

En mamíferos existen diferentes subclases de LT CD4+ (Th1 y Th2) que regulan las respuestas de protección e inmunopatogénesis contra distintos parásitos a través de perfiles diferentes de secreción de linfocinas (Scott, 1991; Shofield *et al*, 1987). Sin embargo en aves no se ha podido establecer una relación al respecto.

Algunos factores solubles derivados de LT (linfocinas) están involucrados en la respuesta inmune contra la coccidiosis (Kogut *et al*, 1988). Los LT de mamíferos secretan IL-2 e IFN- γ después de la estimulación con mitógenos o antígenos (Abbas *et al*, 1994). En los pollos se desconoce el origen preciso de las células que producen estas linfocinas; sin embargo, sus actividades han sido detectadas en sobrenadantes de LT estimulados con Con-A (Gómez, 1995). La aplicación por vía intraperitoneal, intramuscular e intravenosa de este tipo de sobrenadantes protege parcialmente contra la infección por *E. tenella* y *E. acervulina* (García, 1995; Kogut *et al*, 1988; Kogut y Slajchert, 1992; Lillehoj *et al*, 1989).

Estos mismos sobrenadantes inhiben el desarrollo de esporozoitos en cultivos celulares. Se han obtenido resultados semejantes al estimular los LT con antígenos de coccidia, los cuales aunque no tiene un efecto citotóxico sobre los esporozoitos, abaten la habilidad de los macrófagos para transferir esporozoitos a un cultivo celular MDBK (Kogut y Lange, 1989(a,b)).

1.10 El interferón y en ensayos de inmunoprofilaxis

Las citocinas producidas por células esplénicas de huéspedes inmunes contra microorganismos intracelulares son importantes en la respuesta inmune celular. Se ha observado que confieren protección contra *E. tenella*, *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum*, *Chlamydia psittaci*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* y *Listeria monocytogenes*

(Czuprynski *et al*, 1985, 1987, 1988; Leiby *et al*, 1993; Scott, 1991; Suzuki *et al*, 1988; Téllez *et al*, 1993; Vanrompay, 1995).

Actualmente existe evidencia sobre la inhibición de coccidiosis a través de citocinas (García, 1995; Kogut y Slajchert, 1988,1992; Lillehoj *et al*, 1989; Long y Milne, 1971; Rose *et al*, 1991(a)) y factor de transferencia (Klesius y Giambrone, 1984).

En el último lustro se ha descrito que los LT provenientes de pollos inmunizados contra *E. tenella* y estimulados con Con-A secretan linfocinas contenidas en un sobrenadante (denominadas *Eimeria tenella*-immune-lymphokines "ET-ILK") que protege a cultivos celulares de pollo 48 h post-infección con *E. tenella* y reduce la invasión de los esporozoitos a las células hospederas por inhibición de su desarrollo intracelular (Kogut y Lange, 1989(a,b)).

En un ensayo *in vivo* este mismo ET-ILK inoculado intraperitonealmente (IP) a pollos de 14 días de edad y desafiados dos días más tarde con una dosis subletal de *E. tenella* disminuyó la severidad de las lesiones cecales y el número de ooquistes cecales excretados, lo que no ocurrió con el control de linfocinas provenientes de aves no inmunizadas contra *E. tenella* (non immune lymphokines, NILK) (García, 1995; Kogut *et al*, 1988).

Un estudio más específico demostró que la protección *in vivo* e *in vitro* conferida por el ET-ILK se atribuye a linfocinas con peso molecular mayor a 10,000 daltones y que si se diluye disminuye la inhibición de desarrollo del parásito dentro de la célula huésped (Kogut y Slajchert, 1992). La administración IP *in vivo* en dosis mayores a 0.1 mL por ave aumentó significativamente la protección. Este estudio demostró a su vez que la administración IP es hasta ahora la única vía que confiere protección, ya que la administración intramuscular disminuye la protección y cuando se utiliza la vía subcutánea el efecto se nulifica (Kogut y Slajchert, 1992).

El ET-ILK ha demostrado su eficacia *in vivo* cuando se administra hasta 48 h antes del desafío con *E. tenella*, lo que no sucede si son administradas 12 h después del desafío (Kogut y Slajchert, 1992).

El sobrenadante proveniente de LT de aves inmunizadas contra *S. enteritidis* y estimulados con Con-A (*Salmonella enteritidis*-immune-lymphokines "SE-ILK") ha mostrado conferir protección al desafío con *S. enteritidis* en pollitos de 1 día de edad, de 18 días de edad o aplicadas *in ovo* a los 18 días de desarrollo embrionario antes del desafío con

S. enteritidis (McGruder *et al*, 1993, 1995; Téllez *et al*, 1993). Existe protección al día de edad contra *S. gallinarum* y *S. typhimurium* (McGruder *et al*, 1993; Wong, 1994) y cierta protección contra *E. tenella* en pollitos de 1 y 14 días de edad (García, 1995).

El sobrenadante proveniente de LT inmunizados contra *S. gallinarum* y estimulados con Con-A (*Salmonella gallinarum*-immune-lymphokines "SG-ILK") ha mostrado conferir protección en desafíos con *S. gallinarum* (Wong, 1994).

Lo anteriormente expuesto hace suponer que el efecto protector por parte del ET-ILK probablemente se debe a las funciones de las linfocinas anteriormente mencionadas y factiblemente en mayor grado al IFN- γ . Sin embargo existen pocos estudios que evalúen este efecto. Debido a que no se conoce el perfil de secreción del IFN- γ durante el proceso inflamatorio ocasionado por la infección con *E. tenella* se necesita determinar cómo y cuándo se encuentra presente esta citocina (Byrnes *et al*, 1993; Kogut y Lange, 1989(a); Rose *et al*, 1991(a,b)), ya que sólo se ha estudiado su presencia al día 6 en aves inmunes y susceptibles a *E. tenella* (Martín *et al*, 1994) o bien con otro tipo de células como linfocitos de sangre periférica (Breed *et al*, 1997).

Se necesita conocer el perfil de secreción de citocinas en aves susceptibles para evaluar una respuesta primaria y en aves inmunes para evaluar una respuesta secundaria durante todo el periodo de patencia y no únicamente un solo día del mismo.

1.10.1 Mecanismos de acción del interferón γ

Se ha observado que frente a muchos virus, la resistencia de las células animales se incrementa notablemente por efecto de los interferones (grupo de proteínas pequeñas) (Stryer, 1991). Estas observaciones se han realizado para otro tipo de microorganismos no virales (Feng *et al*, 1960; Kogut y Slajchert, 1992; Rose *et al*, 1991(a,b)).

Los interferones son sintetizados y secretados por las células de los vertebrados después de una infección vírica (Fenner, 1974). Se ha reportado que las moléculas de ARN de doble filamento son especialmente eficaces en estimular la secreción de interferones (Gandhi *et al*, 1970; Ito *et al*, 1982). Los cuales son capaces de unirse a la membrana plasmática de otras células del organismo e inducir un estado antiviral (Grossberg, 1987).

Los interferones son muy potentes; una concentración tan baja como 10^{-11} M tiene un efecto antiviral significativo. Se han aislado y purificado tres clases de interferones, interferón α (antes interferón del leucocito), interferón β (antes interferón del fibroblasto) e interferón γ (antes interferón inmune) (NIAID y WHO, 1980). El tamaño oscila entre 15 y 35 Kd (Grossberg, 1987).

Los interferones desarrollan el estado antiviral a través del incremento en la producción de dos enzimas: una proteína quinasa y una oligoadenilato sintetasa (Figura 2, Esquema 1 y 2). Estas enzimas se activan en presencia de ARN de doble cadena. La quinasa activada interfiere con la formación de nuevas cadenas polipeptídicas y la oligoadenilato sintetasa activada conduce a la destrucción de moldes de ARNm y componentes del ARNr en la maquinaria de síntesis de proteínas (Figura 2, Esquema 1 y 2). Estas dos acciones de común acuerdo con el ARN de doble filamento bloquea el crecimiento y proliferación de las células (Grossberg, 1987; Stryer, 1991).

Kagaya *et al* (1989) y Ovington *et al* (1995) han propuesto que las funciones del IFN- γ son principalmente inmunorreguladoras. La función mejor estudiada durante infecciones con *Eimeria spp* es la habilidad del IFN- γ para activar macrófagos e incrementar su capacidad para producir metabolitos reactivos intermediarios (Ovington *et al*, 1995).

Rose *et al* (1991(a)) han propuesto que los LT y el incremento de IFN- γ pueden mediar la inmunidad a *E. vermiformis* sin involucrar cualquier otro tipo de célula inflamatoria, lo que también se ha observado en la protección conferida a cultivos celulares contra la invasión de esporozoitos de *E. tenella* (Kogut y Lange, 1989(a,b)). Además se ha propuesto que el IFN- γ actúa sinérgicamente junto con el TNF- α en la producción de reactivos intermediarios del oxígeno, incrementa el metabolismo oxidativo y la producción de metabolitos en células fagocíticas (Ovington *et al*, 1995).

Se ha observado que *Eimeria spp* es vulnerable al daño inducido por metabolitos oxidativos. El IFN- γ como producto liberado de los LT puede incrementar la habilidad de los monocitos/macrófagos para producir reactivos intermediarios del oxígeno los cuales pueden aniquilar inespecíficamente a esporozoitos intracelulares. Además se ha propuesto que la inducción de óxido nítrico puede ser el mecanismo por el cual el IFN- γ inhibe directamente el desarrollo de *Eimeria* en cultivos celulares (Ovington *et al*, 1995).

1.10.2 El interferón γ como inmunorregulador

El IFN- γ está altamente implicado en la inmunidad contra la coccidiosis, ya que se ha observado que después del tratamiento con IFN- γ a cultivos celulares epiteliales, fibroblastos y MDBK, se inhibe el desarrollo de *E. tenella* y *E. vermiformis* (Kogut and Lange, 1989; Rose *et al*, 1991(a)). El pre-tratamiento con IFN- γ a los esporozoitos no afecta su crecimiento ni desarrollo, lo cual conduce a creer que el interferón altera la respuesta de las células del huésped y no la del parásito.

En los ratones el IFN- γ es responsable de las respuestas primarias a las infecciones con *Eimeria*. La depleción de IFN- γ endógeno con un AcM anti-IFN- γ incrementa la liberación de ooquistes y la mortalidad durante la infección primaria con *E. vermiformis* (Rose *et al*, 1991(a,b)). Esto sugiere que aunque el IFN- γ es importante en limitar la infección primaria, la respuesta a un desafío secundario es mediada por otros mecanismos efectores.

Se ha observado que las células esplénicas incrementan la liberación de IFN- γ después de una infección con coccidias (Breed *et al*, 1997; Martín *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989). Los pollos inmunodeprimidos con dexametasona muestran un decremento en la producción de IFN- γ e IL-2 y un incremento en la susceptibilidad a una infección con *E. mivati*. Estas dos linfocinas muestran un papel importante en la inmunorregulación de la coccidiosis en las aves (Isobe y Lillehoj, 1993; Lillehoj y Trout, 1993).

Debido a que el IFN- γ se ha descrito como la principal citocina inmunorreguladora de la inflamación y de la respuesta inmune celular durante la infección con *E. tenella*, es de extrema importancia conocer el papel preciso que desempeña en las infecciones por coccidia (Delannoy *et al*, 1993; Kogut y Lange, 1989(b); Lillehoj y Trout, 1993; Ovington *et al*, 1995; Rose *et al*, 1991(a,b)).

1.10.3 Importancia del interferón γ

Se ha observado que las linfocinas provenientes de LT estimulados con Con-A, activan a los macrófagos por un mecanismo aún no bien esclarecido, se supone que uno de los responsables de este mecanismo es la presencia de IFN- γ (Breed *et al*, 1997; Kaspers *et al*, 1994; Lillehoj *et al*, 1989;); sin embargo Dijkmans *et al* (1990) y Shultz *et al* (1995) al evaluar un IFN aviar obtenido por ellos, determinaron que no presentó esta función específica.

En un ET-ILK obtenido de un cultivo de LT hiperinmunes a *E. tenella* estimulados *in vitro* con 7.5 µg/mL de Con-A, se observó a través de un ensayo de linfoproliferación que contiene IL-2 y algunas citocinas como IFN-γ y posiblemente TNF-α las cuales incrementan la expresión de moléculas clase I y II del MHC (García, 1995). Para obtener la caracterización funcional de estas linfocinas se utilizó un ensayo de expresión del MHC a través de citometría de flujo con la ventajas descritas por Juárez *et al*, 1996, 1997 (a).

Los resultados de este tipo de ensayos prueban indirectamente la presencia de IFN-γ al observar una de las funciones ya conocidas en mamíferos del IFN-γ como es el incremento de moléculas de clase I y II del MHC en LT. Por lo que el aumento de expresión de moléculas clase I y II del MHC del pollo se debe probablemente al IFN-γ, ya que en estudios independientes efectuados en humanos y ratones ha mostrado tener esta función (Abbas *et al*, 1994; Gerrard *et al*, 1988).

Los estudios realizados con diferentes concentraciones de Con-A (2-40 µg) y diferentes densidades celulares de LT aviares (1×10^7 - 2×10^7 /mL) provenientes de distintas aves, reportan que el IFN-γ es posiblemente la linfocina que se encuentra en mayor cantidad en los SN (Breed *et al*, 1997; Kogut y Lange, 1989(a,b); Prowse y Pallister, 1989; Weiler y Von Bülow, 1987(b)). Se ha determinado su presencia a través de ensayos de actividad antiviral (en su mayoría elaborados con virus de origen no aviar) (Adair *et al*, 1991; Breed *et al*, 1997; Dijkmans *et al*, 1990; Lockhart, 1973; Revel, 1979; Weiler y Von Bülow, 1987(a,b)) y de activación de macrófagos o monocitos (Breed *et al*, 1997; Dijkmans *et al*, 1990; Kaspers *et al*, 1994).

Kogut y Slajchert (1992) han deducido la presencia de IFN-γ en las ET-ILK, mediante su desnaturalización al ser tratadas a 56°C por 30 minutos u 80°C por 10 minutos en condiciones bajas de pH (pH 2) o bien con tripsina. Algunos investigadores han indicado que estas condiciones son las que se requieren para determinar la presencia de IFN-γ (Dijkmans *et al*, 1990; Kogut y Slajchert 1992; Paul, 1993) debido a que el IFN-γ es termosensible; la desnaturalización permite diferenciar su participación, a diferencia de cuando está presente IFN del tipo I (α,β) que es secretado *per se* en cultivos celulares donde existen células epiteliales o endoteliales, por lo que se ha sugerido utilizar esta característica como testigo. Sin embargo existe otro tipo de linfocina termoestable como el TNF-α que puede alterar los resultados de los bioensayos de IFN-γ. Se debe considerar su interferencia en todo tipo de

ensayos con cultivos de LT. Las variables técnicas descritas anteriormente se han aplicado con ligeras modificaciones a otros sobrenadantes crudos (SN) que contienen IFN y se han obtenido resultados similares (Grossberg, 1987; Kogut y Slajchert, 1992; Weiler y Von Bülow, 1987(b)).

Kaspers y colaboradores (1994) obtuvieron un SN de LT esplénicos de pollo estimulados *in vitro* con Con-A a una dosis de 10 µg/mL del cual purificaron parcialmente IFN, el que intervino en el aumento de expresión de moléculas clase II del MHC de monocitos de pollo. Además en un ensayo *in vitro* este SN protegió a cultivos celulares infectados con un agente viral de origen no aviar.

En otro estudio se cuantificó la producción de IFN en diferentes líneas de aves después de la infección con coccidia a través de un ensayo de proliferación de linfocitos periféricos y de bazo (Martín *et al*, 1994). Se determinó que había una diferencia en cuanto a origen de línea aviar e importaba el ser o no homocigótica.

Algunos autores han verificado que al estimular *in vitro* con Con-A a LT provenientes de distintas aves el SN tiene un efecto antiviral, por lo cual aseguraron contar con IFN de manera indirecta. Sin embargo, actualmente no se ha logrado determinar de manera precisa el perfil de secreción de IFN-γ después del desafío con *E. tenella* (Martín *et al*, 1994).

Se debe considerar que la mayoría de los estudios analizados no toman en cuenta el papel que juega la estimulación con Con-A, la densidad de los cultivos celulares, la estimulación en forma de aloantígenos provenientes de la coccidia o de cultivos celulares provenientes de distintas aves, además de no considerar el origen del virus empleado en el ensayo antiviral como posibles factores de interferencia en la secreción y detección de IFN-γ aviar. Al parecer el confuso manejo de estos factores ha contribuido a no precisar exactamente el papel que juega el IFN-γ como inmunorregulador en la inmunidad celular contra *E. tenella*.

Es necesario determinar que días posteriores a la infección se produce IFN-γ y eliminar factores de confusión como son la estimulación con concentraciones altas de Con-A, las diferentes densidades celulares, el procedimiento con aloantígenos y los diferentes tiempos de detección post-desafío.

Con la finalidad de describir los principios que han intervenido en la inmunoprofilaxis con sobrenadantes crudos de linfocitos T que aún no se han explicado satisfactoriamente, es prioritario realizar investigación básica para determinar precisamente los mecanismos de acción atribuidos al IFN- γ en la inflamación y en la inducción de inmunidad celular durante la infección ocasionada por *E. tenella*.

El estudio de los interferones se ha realizado principalmente en el hombre y en el ratón, por lo cual se requiere estudiar sus características como inmunorregulador para fundamentar bases inmunológicas aviares, con las cuales se tenga inferencia comparativa respecto a la investigación inmunológica humana. Este conocimiento contribuye al desarrollo de nuevas metodologías en el estudio e investigación de los aspectos inmunes aún no dilucidados durante las infecciones con *Eimeria spp* en aves y aporta referencias teóricas en la investigación de nuevas técnicas profilácticas, terapéuticas y de control que permitan disminuir este proceso patológico que repercute directamente en la producción avícola.

La presente investigación aborda una estrategia particular en el estudio específico del interferón aviar, investigación básica del sistema inmune celular que permite obtener nuevos conocimientos en el área, los cuales contribuirán directamente en la investigación aplicada para el control preventivo (vacunación, coccidiostatos) y resolutivo (terapéutico) de éste que es el padecimiento más importante dentro de las parasitosis aviares de México y el mundo.

La presente investigación contribuye a la potencial aplicación del conocimiento obtenido sobre futuras investigaciones de vacunas a base de ooquistes atenuados y programas de inmunización. Específicamente proporciona información para conocer el momento en que es secretado el IFN- γ durante el desarrollo de la enfermedad por *E. tenella* en aves susceptibles y en aves previamente inmunizadas.

1.11 Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el perfil de producción de IFN- γ en pollos de engorda susceptibles e inmunes durante una infección con *Eimeria tenella*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1). Eliminar el factor de altas concentraciones de Con-A, concentración celular y aloantígenos, como inductores *per se* de IFN.
- 2). Determinar el día de aumento en la producción de IFN durante la primoinfección por *Eimeria tenella* en aves desafiadas .
- 3). Determinar el día que existe aumento en la producción de IFN durante la infección con *Eimeria tenella* en aves previamente inmunizadas.
- 4). Determinar la aplicabilidad de diferentes técnicas antivirales aviares *in vitro* en la detección de IFN en respuestas primarias y secundarias a la infección con *Eimeria tenella*.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Inóculo parasitario

2.1.1 Obtención del inóculo de *Eimeria tenella*.- Para la inmunización y desafío se utilizó la cepa de *E. tenella* denominada MOR-80 donada por el Dr. Reynaldo Moreno¹, cepa de mediana patogenicidad procedente de una granja de pollo de engorda ubicada en el Estado de Querétaro, México.

2.1.2 Purificación del inóculo de *Eimeria tenella*.- Se determinó la contaminación del inóculo parasitario denominado MOR-80 con ooquistes de *E. acervulina* y *E. brunetti*, por lo cual se procedió a purificar la cepa de *E. tenella* a través de la siguiente metodología:

A partir del primer día de edad se criaron 20 aves convencionales (Arbor Acres x Arbor Acres) en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, la cual fue fumigada con formaldehído-permanganato de potasio y asperjada con formaldehído al 10% durante 40 minutos.

Al día 16 de edad se inocularon 15 aves con 10,000 ooquistes del inóculo denominado MOR-80, cinco aves se mantuvieron como grupo testigo, al día 7 post-inoculación se sacrificaron las aves y se procedió a extraer el tejido cecal. Para la obtención de ooquistes esporulados infectantes el ciego fue procesado de acuerdo a la técnica descrita por Juárez y colaboradores (1997(c), 1998), los ooquistes fueron inoculados por segunda ocasión bajo las mismas condiciones. A partir de los ooquistes esporulados obtenidos del segundo pase se procedió a hacer una dilución 1:500 en agar noble al 2.5% (GIBCO® Laboratories); antes de enfriar el agar se vertió sobre portaobjetos estériles hasta formar una capa delgada y uniforme.

Los portaobjetos se observaron al microscopio compuesto (seco fuerte) y por medio de la escala milimétrica se determinó la medida exacta de cada ooquiste de *E. tenella*. Después de verificar que no hubiera ningún otro ooquiste en el mismo plano focal, el agar fue cortado con el bisel de una aguja hipodérmica (22 x 1.4 Becton Dickinson®) en forma cuadrada alrededor del ooquiste, después se depositó en un contenedor. Posteriormente se inocularon cinco aves, cada una con 5 ooquistes seleccionados. A los 7 días post-inoculación se sacrificaron y se determinó qué ave presentaba infección, fue seleccionada

¹ Departamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM

aquella donde los ooquistes correspondían a la medida estándar de *E. tenella*. Después esta cepa se amplificó infectivamente por dos ocasiones con 10 aves cada una. Los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se ha descrito en la técnica por Hodgson, 1970; Kao y Ungart (1994) Long y Rowell (1958) y Long *et al* (1976).

2.2 Inóculo viral

2.2.1 Obtención y preparación de los inóculos virales.- Para realizar las pruebas de evaluación de actividad de IFN- γ sobre la inhibición de muerte celular se utilizaron tres diferentes virus.

El virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) utilizado fue una cepa viral velogénica viscerotrópica (Chimalhuacán) donada por el QBP Alejandro Méndez², la cual fue cosechada en embrión de pollo y purificada en FEP. Se inoculó a un título constante en el cultivo celular de FEP que contenía los sobrenadantes de citocinas evaluadas; de acuerdo a la técnica descrita por Shat y Purchase (1989) se efectuaron las diluciones requeridas para obtener un título de 100 DICC 50%/0.1mL (Juárez, 1995).

El virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) empleado fue una cepa vacunal de virulencia intermedia (Lukert), facilitada por el Tec. Juan Merino³, fue cosechada a partir de FEP y se inoculó a un título de 100 DICC 50%/0.05mL conforme a la técnica descrita por Shat y Purchase (1989).

El virus de la estomatitis vesicular (VEV) utilizado fue la cepa Indiana, que fue cosechada en forma de sobrenadante a partir de un cultivo de células VERO (Barrón *et al*, 1989)², se inoculó al cultivo celular de FEP a un título constante de 100 DICC 50%/0.1mL, según la técnica descrita por Martín *et al* (1994), Prowse y Pallister (1989) y Shat y Purchase(1989).

2.3 Cultivos celulares

2.3.1 Cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo.- Los cultivos celulares de fibroblastos se realizaron a partir de embriones de pollo LPE de 9 a 11 días de edad, de acuerdo a la técnica descrita por Sekellick y Marcus (1986) con las modificaciones hechas por Shat y Purchase(1989) y las efectuadas para efectos de la presente investigación. Las

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN

³ Departamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM

células fueron previamente tripsinizadas (tripsina al 1%) a partir de cinco embriones LPE, disgregadas durante 20 minutos a 37°C, filtradas con cinco capas de gasa estéril, centrifugadas (400 x g durante 10 minutos) y suspendidas en medio esencial mínimo ((MEM); GIBCO® Laboratories) con 5% de SFB. La viabilidad e integridad celular se evaluó por medio de la tinción excluyente de azul tripan (trypan blue stain 0.4% Life Technologies Grand Island NY USA), la concentración final se ajustó a 1.5×10^5 células/mL. Se agregaron 100 µl/pozo de la suspensión a una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunc F96) y se dejaron incubar a 37.5°C y 5% de CO₂, hasta que se observó un establecimiento del monoestrato celular, momento indicado para su utilización en el ensayo antiviral (Castañón, 1974; Lomniczi, 1973; Sheaff *et al*, 1972; Wertz *et al*, 1994).

2.3.2 Cultivos celulares de línea.- Los cultivos de línea se efectuaron con la finalidad de replicar y titular el virus de la estomatitis vesicular.

Se utilizaron cultivos de células Vero, las que se disgregaron a partir de un cultivo confluyente se adicionó a la botella de cultivo (260 mL NUNCLON, Nunc) 1.5 mL de una solución de tripsina-verseno al 1%. Se dejó actuar sobre la capa celular durante 20 segundos la solución se eliminó por la cara opuesta a la capa celular. La solución de tripsina-verseno residual se dejó actuar el tiempo suficiente para que las células se disgregaran (la capa celular se tornó opaca aproximadamente en 7 minutos a 37.5°C). Se dieron ligeros golpes en la botella, de manera que la capa celular se desprendiera totalmente de su soporte, posteriormente se observó al microscopio para verificar el desprendimiento. Se adicionaron 5 mL de MEM y el contenido se homogeneizó por pipeteo.

Después de verificar la viabilidad e integridad celular se realizó el conteo con tinción excluyente de azul tripan, para replicación viral las densidades celulares requeridas se ajustaron a frascos de cultivo y para titulación a placas de 96 pozos (Nunc 96) se adicionó la cantidad de MEM necesaria para conservar la relación fluido:gas de 1:8 (Barrón *et al*, 1989).

2.4 Cultivo de linfocitos T

2.4.1 Obtención de los sobrenadantes (SN) con la técnica de columnas de fibra de nilón

La obtención de células de bazo, aislamiento de LT, producción y preparación de citocinas, se realizaron conforme a la técnica descrita por Coligan *et al* (1992), Kogut y Slajchert (1992) y Téllez *et al* (1993), la que fue modificada de acuerdo a los requerimientos específicos del presente estudio:

a) Preparación de la suspensión de células esplénicas.- Se colectaron asepticamente los bazos de las aves. Se pasaron a través de bolsas de tela de organza (4 x 4 cm) utilizando solución balanceada de Hank's (HBSS; Sigma Chemical St Louis MO). Las células esplénicas provenientes de cuatro aves se juntaron y centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a 4°C (Sorvall RT 6000). A continuación se lisaron los eritrocitos mediante la resuspensión de las células en tampón de lisis (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 1.0 mM). Posteriormente las células se sometieron a dos lavados con HBSS. Se realizó una dilución 1:25 en medio frío RPMI 1640 y se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos a 4°C. Se efectuó una sola suspensión celular (6 x 10⁶ células/mL) en medio RPMI 1640 libre de suero, suplementado con 2-mercaptoetanol, L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E (Lakeside, Laboratories USA) (Gómez, 1995; Kogut y Slajchert, 1992).

b) Aislamiento de linfocitos T.- Para realizar la purificación de LT a partir de la población de células de bazo, los macrófagos se eliminaron al incubar 12 mL de la suspensión celular preparada con anterioridad en placas de Petri plásticas de 100 x 15 mm (FALCON® 1029 Becton Dickinson USA) durante 2 h a 37.5°C y 5% de CO₂ en la incubadora anteriormente descrita. Las células no adherentes (linfocitos T y B) se decantaron de las cajas de Petri plásticas contenidas en el sobrenadante. Posteriormente 10 mL de estas células no adherentes se pasaron a través de columnas de fibra de nilón (Fenwal Laboratories, Morton Grove, IL), según lo descrito por Julius *et al* (1973) aplicado por Gómez *et al* (1995) Kogut y Slajchert (1992) y Téllez *et al* (1993), además de las modificaciones efectuadas para efecto del presente estudio:

Las columnas se prepararon con fibra de nilón a razón de 1.0 g la cual se introdujo sin compactar en jeringas de 10 cc, que posteriormente se esterilizaron en autoclave (15

Libras/pulgada² 120°C 15 minutos). Las columnas se incubaron con medio RPMI 1640 tibio más 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO® Laboratories) durante una hora a 37.5°C en una incubadora con ambiente humidificado y 5% de CO₂.

Se pasaron a través de las columnas 3 x 10⁸ células contenidas en 10 mL de medio RPMI 1640 y se incubaron nuevamente durante una hora a 37.5°C en la incubadora anteriormente descrita. Las células que no se adhirieron a la fibra de nilón fueron eluidas de la columna con 12 mL de medio RPMI 1640 a 37.5°C. Las células eluidas se lavaron y su viabilidad e integridad se determinó mediante exclusión de células muertas con la tinción de azul tripan. La suspensión celular se ajustó a la concentración deseada (5 x 10⁶ células viables/mL con un máximo de 5% de macrófagos) en medio RPMI 1640 sin suero más P-E.

Para la preparación de citocinas la densidad celular requerida se ajustó con medio RPMI 1640 sin suero, con Con-A (Sigma Chemical St Louis MO) y P-E.

2.4.2 Obtención de los sobrenadantes (SN) a través de la técnica de gradientes de ficoll hypaque

La obtención de células de bazo y la producción y preparación de citocinas se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Coligan *et al* (1992), Prowse y Pallister (1989) y Weiler y Von Bülow (1987(a,b)) con algunas modificaciones de acuerdo a las necesidades específicas del presente estudio:

a) Preparación a partir de la suspensión de células esplénicas.- Se colectaron asepticamente los bazos de las aves en forma individual. Se pasaron a través de tela de organza utilizando HBSS. Las células esplénicas provenientes de una sola ave se centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se suspendieron en 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2-mercaptoetanol, L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E.

b) Aislamiento de linfocitos T.- Para obtener la purificación de LT a partir de la población de células de bazo provenientes de una sola ave, la suspensión celular obtenida fue agregada lentamente a través de la pared de un tubo conteniendo 3 mL de ficoll hypaque (ficoll hypaque ® densidad 1.070 ± 0.001 g/mL Sigma Chemicals St Louis MO) la cual se centrifugó a 300 x g durante 20 minutos a 18°C. Posteriormente la interfase se recuperó con pipeta Pasteur. Se suspendió en 15 mL de HBSS y se enjuagó en tres ocasiones por medio de suspensión y centrifugación a 250 x g durante 10 minutos a 4°C. El botón celular

obtenido al final se suspendió con RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2-mercaptoetanol, L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E.

Los macrófagos se eliminaron incubando 12 mL de la suspensión celular en placas de Petri plásticas (100 x 15 mm) durante 2 h a 37.5°C 5% CO₂; las células no adherentes contenidas en el sobrenadante fueron decantadas y centrifugadas a 250 x g durante 10 minutos a 4°C. Para la preparación de citocinas las suspensiones celulares se ajustaron en suspensiones celulares individuales (5 x 10⁶ células/mL) en medio RPMI 1640 sin suero, suplementado con 2.5 µg de Con-A, 2-mercaptoethanol, L-glutamina (mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E (Gómez, 1995; Kogut y Slajchert, 1992).

2.5 Preparación de las citocinas

Las citocinas se obtuvieron a partir de LT purificados por los dos procedimientos anteriormente descritos (técnica de columnas de fibra de nilón y técnica de gradientes de ficoll hypaque) mediante la incubación (5 x 10⁶ células/mL) con medio RPMI 1640 suplementado con 2.5 µg/mL de Con-A, 2-mercaptoetanol (5x10⁵ M), L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM) y P-E, en cajas de cultivo celular (Nunc 50 mL) por 72 h a 37.5°C en una incubadora con 5% de CO₂. Después de la incubación los SN se colectaron y todas las células remanentes se eliminaron por medio de centrifugación a 1300 x g durante 20 minutos.

Para inactivar la Con-A excedente se adicionó delta alfa metil-manopiranosida (40 µg /mL; Sigma Chemicals St Louis MO). Los SN obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su evaluación en el ensayo antiviral (Kogut y Slajchert 1992; Martín *et al*, 1994).

2.6 Administración de las citocinas a las placas

Para la evaluación del IFN producido durante la respuesta primaria en respuesta a la infección con *E. tenella*, en el primer y segundo experimento se empleó un ensayo antiviral *in vitro*, en el cual se utilizaron diluciones dobles de los SN obtenidos de los cultivos de LT provenientes de aves desafiadas y no desafiadas. Con la finalidad de evaluar la actividad del IFN en la inhibición de la muerte celular de los fibroblastos de embrión de pollo (FEP) ocasionada por la inoculación con el VENC, el VIBF y el VEV, se agregaron tres réplicas de cada SN al cultivo celular de FEP los que se habían incubado 20 horas antes de agregar la suspensión viral.

En el tercer y cuarto experimento se evaluó la cantidad de IFN presente durante la respuesta secundaria de las aves a una infección con *Eimeria tenella*. Para la administración de las citocinas a las placas se aplicó el procedimiento anteriormente descrito. Para los diferentes tiempos post-desafío se incluyeron todos los SN provenientes de aves desafiadas y sin desafiar (Kaspers *et al*, 1994; Kogut y Slajchert, 1992; Martín *et al*, 1994).

2.7 Administración del virus a las placas

Para la prueba de interferencia del IFN *in vitro*, a cada pozo de cultivo celular se le depositó directamente 100 µl de una dosis constante del virus utilizado (VENC, VIBF y VEV) el cual fue estandarizado previamente a 100 DICC 50%/mL (ajustados a partir del medio cosechado) como ya se ha descrito (Agarwal *et al*, 1996, Kohase *et al*, 1986; Richman *et al*, 1970).

2.8 Ensayo antiviral

2.8.1 Utilización de un ensayo antiviral con la finalidad de evaluar el contenido de IFN de cada uno de los sobrenadantes.- En una placa de cultivo celular (Nunc F96) que contenía 100 µl/pozo de RPMI 1640 sin suero, se les agregó 100 µl de los SN provenientes de cada experimento en la primera línea de cada placa, un SN con IFN de referencia⁴ (80 UI/mL) que se utilizó como testigo positivo y RPMI 1640 sin suplementar que se empleó como testigo negativo. A partir de ahí se realizaron diluciones dobles seriadas por triplicado hasta la dilución 1:256 en todos los SN del IFN de Referencia y del RPMI 1640 sin suplementar, (Breed *et al*, 1997; Brugh, 1978; Juárez, 1995; Prowse y Pallister, 1989). Posteriormente 100 µl de los SN de cada pozo se transfirieron a otra placa homóloga de cultivo celular (Nunc F96) que contenía una cantidad estandarizada de FEP. De estas placas donde se hallaba establecido el monoestrato celular el medio fue removido de cada pozo, se agregaron 100 µl de MEM sin suero para lavar por una ocasión las células, reemplazándolo posteriormente con 100 µl de las respectivas diluciones de SN en RPMI 1640 sin suplementar, cada dilución se efectuó por triplicado.

Para evaluar una probable toxicidad de las citocinas se utilizaron como testigo 100 µl de la dilución más baja de cada SN la cual se depositó en un pozo con FEP.

⁴ (1^{ra} Ifn Ref prep Inter Chick 67/18, WHO International Laboratory for Biological Standard / National Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Hamstead, London Nw3 6 RB, England)

Los fibroblastos se dejaron incubar por 20 h a 37°C y 5% de CO₂. Al término de esta incubación los SN fueron removidos de cada pozo y las células se lavaron dos veces con MEM sin suero, después se incorporaron a cada pozo 100 µl de cada uno de los virus a un título constante, como anteriormente se ha descrito. Cuando el testigo positivo de cada virus indicó efecto citopático (CPE) se realizó la evaluación con la calificación del efecto citopático particular de cada uno de los virus empleados, se dejó en la placa por 48 ó 72 h más de incubación (mismos parámetros) según lo descrito por Castañon (1974) para el VENC, por Shat y Purchase (1989) y Fenner (1974) para el VIBF y por Rubinstein *et al* (1981) para el VEV. Para determinar el efecto citopático las placas se examinaron visualmente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (Adair *et al*, 1991; Castañon, 1974; Dijkmans *et al*, 1990; Rubinstein *et al*, 1981).

2.8.2 Evaluación del ensayo antiviral

Las células viables y las que mostraron efecto citopático fueron determinadas según lo descrito por Dijkmans *et al* (1989, 1990), Martín *et al* (1994) y Rubinstein *et al* (1981). En cada uno de los bioensayos efectuados para cada SN el título de IFN se determinó en base a log₂, de acuerdo al procedimiento empleado para la titulación del control positivo que contiene IFN de pollo diluido a una concentración de 80 UI/mL (preparación 67/18, national institute for biological standards and control, Hamstead, Londres) el cual protege consistentemente hasta la dilución 6 log₂ contra los efectos citopáticos inducidos por 100 DICC 50% del VEV cepa Indiana (Dijkmans *et al*, 1990; Martín *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989).

Los resultados se reportan como el título de interferón obtenido a partir de la dilución log₂ en la que el sobrenadante específico mostró el 100 % de protección sobre la muestra celular contra el virus. Los títulos se expresan como un promedio de las tres réplicas de cultivo celular de cada SN evaluado (Adair *et al*, 1991; Kaspers *et al*, 1994; Prowse y Pallister, 1989). Se realizó un análisis estadístico en cada uno de los cuatro experimentos para determinar diferencias entre títulos de protección mostrados a los diferentes días después de la inoculación con ooquistes esporulados de *E. tenella* (Gill, 1978).

2.9 Animales de experimentación para la obtención de los SN

2.9.1 Primer y segundo estudio experimental.- Se utilizaron 105 pollos de engorda convencionales Hubbard x Hubbard⁵ los cuales se recibieron al día de edad en las unidades de aislamiento del DPA: Aves de la FMVZ de la UNAM; fueron agrupados aleatoriamente y alojados en baterías de 5 niveles (1 X 1.5 m) con calefacción eléctrica.

Las aves recibieron alimento estándar con un 22 % de P.C. y 2900 Kcal de energía metabolizable/Kg sin anticoccidiano, se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* (Juárez, 1995). Cuando tuvieron 20 días de edad, 70 aves fueron desafiadas con *E. tenella* a una dosis de 1×10^4 ooquistes/1mL/ave, 35 permanecieron como testigos aplicándoles únicamente 1mL de PBS/ave.

Las 60 aves del primer experimento fueron sacrificadas secuencialmente para la obtención de los bazos los que se juntaron para formar 2 conglomerados de células (mezclas celulares) provenientes de las aves desafiadas y un conglomerado de las aves testigo (Kogut y Slajchert, 1992), que se utilizaron para la obtención de los SN a los días indicados en el diseño experimental.

Para el segundo estudio se sacrificaron 45 aves secuencialmente para la obtención de LT a partir del bazo de una sola ave, los que se emplearon para obtener los SN evaluados a los días indicados en el diseño experimental del segundo estudio.

2.9.2 Tercer y cuarto estudio experimental.- Se utilizaron 96 pollos de engorda convencionales Hubbard x Hubbard de cuatro semanas de edad. Fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de crianza utilizadas en los dos primeros experimentos.

En el tercer experimento, 32 aves de veinte días de edad fueron desafiadas con *E. tenella* a una dosis de 1×10^4 ooquistes/1mL/ave. Cuando las aves tuvieron 34 días de edad, las 32 aves previamente desafiadas se desafiaron nuevamente con 5×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella*. Como grupo testigo se utilizaron 16 aves que recibieron únicamente 1mL de PBS/ave, las que se mantuvieron en condiciones ambientales semejantes al grupo desafiado, fueron monitoreadas para determinar una probable infección por *Eimeria spp.* Las aves fueron sacrificadas secuencialmente para obtener los bazos en forma individual, posteriormente se formaron conglomerados celulares, los que se utilizaron para la obtención de SN a los días indicados en el diseño experimental del tercer estudio.

⁵ Incubadora comercial (Cuernavaca, Morelos; México)

En el cuarto experimento 32 aves de diez días de edad del grupo experimental fueron expuestas durante 10 días con 1000 ooquistes/1mL/día/ave de *E. tenella* con la finalidad de inducir una inmunidad sólida hacia las coccidias (Joiner y Norton, 1976; Long *et al*, 1986; Nakai *et al*, 1992). Cuando las aves tuvieron 4 semanas de edad 10 días después de la última dosis inmunitaria, las 32 aves previamente inmunizadas se desafiaron recibiendo 5×10^5 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella*. Como grupo testigo se utilizaron 16 aves que no recibieron ooquistes de *E. tenella* y únicamente se les proporcionó 1mL/ave de PBS, se mantuvieron bajo condiciones ambientales semejantes en una unidad de aislamiento separada y se monitorearon para evaluar la presencia específica de *Eimeria spp*.

Las aves fueron sacrificadas para la obtención de los bazos en forma individual, posteriormente se juntaron para formar 3 conglomerados celulares (Byrnes *et al*, 1993; Kogut y Slajchert, 1992; Téllez *et al*, 1993) que se utilizaron para la obtención de los SN a los días indicados en el diseño experimental del cuarto estudio.

2.10 Diseño experimental

2.10.1 Primer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)

Determinación de IFN en la infección primaria con *Eimeria tenella* (técnica de purificación por columnas de fibra de nilón).- Las aves mantenidas según la metodología descrita, se dividieron en dos grupos: el grupo experimental desafiado con *E. tenella* compuesto de 40 aves y el grupo testigo de 20 aves sin desafiar. Al día 20 de edad el grupo experimental fue desafiado con una dosis de 1×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella*, mientras que el grupo testigo permaneció sin desafiar y recibió únicamente 1mL/PBS/ave.

A los días 1, 3, 5, 7 y 9 post-desafío, ocho aves del grupo experimental y cuatro del grupo testigo se sacrificaron por dislocación cervical, con la finalidad de obtener un cultivo celular de LT purificados a partir de los bazos, los cuales se juntaron en dos conglomerados del grupo experimental, cada conglomerado de cuatro bazos y un conglomerado de cuatro bazos del grupo testigo. Los cultivos esplénicos de los dos grupos se sometieron a la metodología descrita para la obtención de los SN por medio de la purificación de LT con columnas de fibra de nilón (3 SN por día).

Posteriormente se realizó el ensayo antiviral para la evaluación del contenido de IFN de cada uno de los 15 sobrenadantes obtenidos a los días 1, 3, 5, 7 y 9.

PRIMER ESTUDIO EXPERIMENTAL :

Aves de 20 días	Toma de bazos para cultivo celular en días post-desafío con <i>E. tenella</i>				
	1	3	5	7	9
Experimental	8 aves*	8 aves	8 aves	8 aves	8 aves
Testigo	4 aves	4 aves	4 aves	4 aves	4 aves

* De cada cuatro aves se realizó un cultivo de células esplénicas en forma de conglomerado.

2.10.2 Segundo estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)

Determinación de IFN en la infección primaria con *Eimeria tenella* (técnica de purificación por gradientes de ficoll hypaque).- El segundo experimento se dividió en dos grupos: el grupo experimental de 30 aves y el grupo testigo de 15 aves, al día 20 de edad el grupo experimental se desafió con una dosis de 1×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella*, mientras que el grupo testigo sin desafiar recibió únicamente 1mL/PBS/ave.

A los días 1, 3, 5, 7 y 9 post-desafío, seis aves del grupo experimental y tres del grupo testigo se sacrificaron por dislocación cervical. Se obtuvieron los bazos en forma individual y los cultivos esplénicos de los dos grupos se sometieron a la metodología descrita para la obtención de los SN por medio de la purificación de LT con gradientes de ficoll hypaque (3 SN por día).

Posteriormente se realizó el ensayo antiviral para la evaluación del contenido de IFN de cada uno de los 45 sobrenadantes obtenidos los días 1, 3, 5, 7 y 9.

SEGUNDO ESTUDIO EXPERIMENTAL :

Aves 20 días	Toma de bazos para cultivo celular en días post-desafío con <i>E. tenella</i>				
	1	3	5	7	9
Experimental	6 aves*	6 aves	6 aves	6 aves	6 aves
Testigo	3 aves	3 aves	3 aves	3 aves	3 aves

* De cada ave se realizó un cultivo de células esplénicas en forma individual.

2.10.3 Tercer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)

Determinación de IFN en la infección secundaria con *Eimeria tenella*.- A partir de las aves de cuatro semanas de edad se formaron dos grupos: 32 aves del grupo experimental que previamente habían recibido una sola dosis de 1×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella* al día veinte de edad y 16 aves del grupo testigo. El grupo experimental fue desafiado a los 34 días de edad con 5×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella*. El grupo testigo permaneció sin desafiar y recibió únicamente 1mL/PBS/ave.

A los días 1, 3, 7 y 9 post-desafío, se sacrificaron por dislocación cervical ocho aves del grupo experimental y cuatro del grupo testigo, para los cultivos de LT se juntaron cuatro bazos del grupo experimental en dos conglomerados y cuatro bazos del grupo testigo en un conglomerado. Los cultivos esplénicos de los dos grupos se sometieron a la metodología anteriormente descrita para el primer estudio por medio de la purificación de LT con columnas de fibra de nilón (3 SN por día).

Posteriormente se realizó el ensayo antiviral para evaluar el contenido de IFN en cada uno de los 3 sobrenadantes obtenidos a los días 1, 3, 7 y 9.

TERCER ESTUDIO EXPERIMENTAL :

Aves 34 días	Toma de bazos para cultivo celular en días post-desafío con <i>E. tenella</i>			
	1	3	7	9
Experimental	8 aves*	8 aves	8 aves	8 aves
Testigo	4 aves	4 aves	4 aves	4 aves

* De cada cuatro aves se realizó un cultivo de células esplénicas en forma de conglomerado.

2.10.4 Cuarto estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)

Determinación de IFN en la infección secundaria con *Eimeria tenella* en un programa de inmunización con refuerzo antigénico.- Se formaron dos grupos a partir de las aves de cuatro semanas de edad: 32 aves del grupo experimental que previamente habían sido inmunizadas durante 10 días con *E. tenella* y 16 aves del grupo testigo, las cuales se

mantuvieron en unidades separadas. El grupo experimental fue desafiado 10 días después de la última inmunización (a los 30 días de edad) con 5×10^4 ooquistes/1mL/ave de *E. tenella* según lo descrito por Kogut y Slajchert (1992). El grupo testigo permaneció sin desafiar y únicamente recibió 1mL/PBS/ave.

A los días 1, 3, 7 y 9 post-desafío, se sacrificaron por dislocación cervical ocho aves del grupo experimental y cuatro del grupo testigo, para los cultivos de LT se juntaron en dos conglomerados de cuatro bazos del grupo experimental y un conglomerado de cuatro bazos del grupo testigo. Los cultivos esplénicos de los dos grupos se sometieron a la metodología anteriormente descrita para el primer estudio por medio de la purificación de LT con columnas de fibra de nilón (3 SN por día).

Posteriormente se realizó el ensayo antiviral para evaluar el contenido de IFN en cada uno de los 3 sobrenadantes obtenidos a los días 1, 3, 7 y 9.

CUARTO ESTUDIO EXPERIMENTAL :

Aves 30 días	Toma de bazos para cultivo celular en días post-desafío con <i>E. tenella</i>			
	1	3	7	9
Experimental	8 aves*	8 aves	8 aves	8 aves
Testigo	4 aves	4 aves	4 aves	4 aves

* De cada cuatro aves se realizó un cultivo de células esplénicas en forma de conglomerado.

2.11 Evaluación de los estudios experimentales

Títulos de IFN.- Los títulos de IFN se determinaron a partir de la dilución donde se observó protección completa por parte de los SN obtenidos de la incubación de LT esplénicos de cada ave de los dos grupos de cada experimento contra el efecto viral, los resultados se reportan como logaritmo base 2 (\log_2) (Martin *et al*, 1993; Prowse y Pallister, 1989).

Grado de severidad de la infección por *E. tenella*.- Para evaluar la patogenicidad de *E. tenella* en cada uno de los programas experimentales de desafío, a las aves sacrificadas en cada ocasión se les determinó el grado de lesiones según lo descrito por Johnson y Reid

(1970). Se cuantificó la eliminación de ooquistes en heces con la técnica descrita por Long y Rowell (1958) inmediatamente después del sacrificio de las aves se evaluó la cantidad de ooquistes en ciegos a través de la técnica de Juárez *et al* (1997(b), 1998).

2.12 Análisis estadístico

Evaluación de las diferencias entre grupos desafiados y grupos testigo.- Se utilizaron las lecturas de los ensayos antivirales por medio del título de IFN en \log_2 de cada uno de los cuatro experimentos (Prowse y Pallister, 1989).

Para evaluar las diferencias entre los grupos desafiados y sin desafiar se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con una transformación de los datos a través de raíz cuarta del \log_2 (Gill, 1978).

Para valorar las diferencias estadísticas significativas entre los grupos se empleó la prueba de Dunnet por medio del paquete estadístico SAS, se estipuló un nivel de significancia para alfa de $p < 0.05$ (Luginbuke y Schlotzhaver, 1987; Zar, 1996).

Evaluación de las dos técnicas de purificación de LT durante la infección primaria con *E. tenella*.- Las lecturas de IFN \log_2 de cada día de muestreo se transformaron por medio de raíz cuarta, los títulos de los SN de linfocitos purificados por columnas de fibra de nilón, fueron comparados con los respectivos títulos de IFN \log_2 de los SN obtenidos de linfocitos purificados por gradientes de ficoll hypaque por medio de un ANDEVA, dentro de cada uno de los ensayos antivirales (VIBF (columnas) vs. VIBF (ficoll) y VENC (columnas) vs. VENC (ficoll)) (Gill, 1978).

Para valorar las diferencias estadísticas significativas entre las medias, dentro de cada tipo de ensayo se utilizó la prueba de Tukey a través del paquete estadístico SAS, se determinó un nivel de significancia estadística para alfa de $p < 0.05$ (Gill, 1978; Luginbuke y Schlotzhaver, 1987).

Evaluación entre los dos tipos de ensayo antiviral.- En cada uno de los cuatro experimentos las lecturas de IFN \log_2 de cada día de muestreo, obtenidas a partir de los ensayos antivirales (VIBF y VENC) fueron comparadas entre sí utilizando un ANDEVA con datos transformados como raíz cuarta del \log_2 (Gill, 1978).

Para valorar las diferencias estadísticas significativas entre los dos diferentes tipos de ensayo antiviral se utilizó la prueba "t" de Student a través del paquete estadístico PLOT-40, se estipuló un nivel de significancia para alfa de $p < 0.05$ (Gill, 1978; Zar, 1996).

Determinación de diferencias entre los distintos días post-inoculación.- Dentro de cada experimento y para determinar diferencias en los títulos de IFN \log_2 obtenidos entre los diferentes días de muestreo post-inoculación, en cada ensayo antiviral (VIBF y VENC) se utilizó un ANDEVA con datos transformados como raíz cuarta del \log_2 (Gill, 1978).

La comparación múltiple de las medias entre cada día post-inoculación se realizó por medio del paquete estadístico SAS a través de la prueba de Duncan con un nivel de significancia estadística para alfa de $p < 0.05$ (Gill, 1978; Luginbuke y Schlotzhaver, 1987).

Determinación del grado de infectividad de *E. tenella* en cada uno de los diseños experimentales de desafío.- En cada programa de desafío se determinó el grado de patogenicidad de la cepa de *E. tenella* por medio de la cantidad eliminada de ooquistes en ciegos y heces, así como por el grado de severidad de lesiones (Juárez *et al*, 1997(b), 1998; Johnson y Reid, 1970).

La diferencia entre conteos de cada uno de los diseños de desafío se determinó por medio de ANDEVA (Gill, 1978; Juárez *et al*, 1997(b)).

Las diferencias significativas entre las medias de los conteos se evaluaron con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a través del paquete estadístico SAS, se determinó un nivel de significancia estadística para alfa de $p < 0.05$ (Luginbuke y Schlotzhaver, 1987).

Para determinar diferencias en la severidad de lesiones entre cada uno de los diseños experimentales de desafío se utilizó la prueba no paramétrica de Kruscall-Wallis. Las diferencias entre medianas de grupos se determinaron con la prueba U de Mann-Witney a una significancia estadística de $p < 0.05$ (Zar, 1996)

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Primer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)

En la infección primaria con *E. tenella* donde se utilizaron linfocitos purificados en columnas de fibra de nilón estimulados *in vitro* con Con-A durante 72 horas, se observó un patrón de secreción de IFN distinto al presentado por el grupo testigo. En la evaluación antiviral con el VIBF se observó que el IFN se comenzó a incrementar del día 3 PI hasta el día 5 PI cuando fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) respecto al grupo testigo (Figura 3), posteriormente se observó una baja en el nivel de actividad antiviral al día 7 PI que aunque fue diferente al grupo testigo ($p < 0.05$) logarítmicamente fue menor a la del día 5 PI, sin embargo, al día 9 PI el nivel se incrementó ligeramente ($p < 0.05$).

En los resultados del ensayo antiviral utilizando el VENC como sistema detector de IFN se observó un comportamiento similar al patrón de secreción determinado en el ensayo con el VIBF, a excepción del día 1 PI donde con el VENC se determinó una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en relación a su correspondiente grupo testigo (Figura 3).

En la comparación de los dos sistemas antivirales de detección de IFN únicamente al día 1 y 5 PI existió diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los títulos obtenidos con el VIBF y los títulos obtenidos con el VENC (Figura 4).

Al analizar el patrón de secreción de IFN de cada día PI con 10,000 ooquistes de *E. tenella* ave, se determinó que los títulos obtenidos con el ensayo del VIBF al día 5 PI, no son diferentes a los obtenidos con el IFN de referencia, ni con los observados al día 3 y 9 PI ($p > 0.05$), pero sí con los obtenidos al día 1 y 7 PI y con los observados en el grupo testigo sin infectar ($p < 0.05$) (Cuadro 1). Los títulos obtenidos al día 3 PI y 9 PI fueron estadísticamente semejantes entre ellos pero diferentes ($p < 0.05$) a los obtenidos al día 1 PI, al del IFN de referencia y a los obtenidos para el grupo testigo sin infectar (Cuadro 1).

El título obtenido al día 1 PI fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al obtenido para el resto de los demás días PI y al del IFN de referencia, mas no fue diferente al título determinado al día 7 PI y al del grupo testigo sin infectar (Cuadro 1).

Al evaluar el patrón de secreción de IFN por medio de los títulos obtenidos cada día PI con el ensayo del VENC se determinó que el título obtenido al día 1 PI fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al obtenido los días 7 y 9 PI, además de los observados para el grupo testigo del IFN de referencia y al observado para el grupo testigo sin infectar; sin embargo, no fue distinto al título determinado para los días 3 y 5 PI. Los títulos obtenidos los días 3, 5, 7 y 9 PI no fueron estadísticamente distintos ($p > 0.05$); sin embargo, sí fueron diferentes a los dos grupos testigo ($p < 0.05$) (Cuadro 1).

3.2 Segundo estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta primaria)

Los linfocitos purificados a través de gradientes de ficoll hypaque y estimulados *in vitro* con Con-A en la infección primaria con *E. tenella*, presentaron una cinética de secreción de IFN diferente a la mostrada por los SN del grupo testigo de linfocitos de aves sin infectar pero estimulados con Con-A. El comportamiento de secreción cada día PI se comportó de manera análoga al comportamiento observado en el primer estudio, sin embargo, los valores obtenidos en el ensayo con el VENC fueron más elevados que los determinados con el mismo ensayo antiviral en el primer estudio.

En la evaluación con el VIBF se observó que el IFN se comenzó a elevar a partir del día 1 PI hasta el día 5 PI cuando fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) respecto a su grupo testigo, al día 7 PI se observó una baja del nivel de actividad antiviral a un punto basal, posteriormente al día 9 PI este nivel se elevó ligeramente ($p < 0.05$) (Figura 5).

En el ensayo antiviral con el VENC se observó un comportamiento semejante al patrón de secreción determinado para el ensayo con el VIBF, sin embargo al día 1 PI el ensayo del VENC presentó una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en relación a su grupo testigo (Figura 5).

Al comparar los dos sistemas antivirales de detección de IFN entre los títulos obtenidos con el VIBF y los títulos obtenidos con el VENC hubo diferencia ($p < 0.05$) únicamente al día 1 PI (Figura 6).

Al evaluar el patrón de secreción de IFN cada día PI con *E. tenella*, se determinó que los títulos obtenidos con el ensayo de VIBF al día 1 PI no fueron diferentes a los obtenidos para el grupo testigo sin infectar y a los obtenidos los días 3, 5 y 7 PI, sin embargo el título del día 1 y 3 PI y el del grupo testigo sin infectar fueron diferentes ($p < 0.05$) al título del IFN de referencia (Cuadro 2). El título del día 1 PI fue diferente al obtenido el día 9 PI. No hubo diferencias entre los títulos determinados los días 3, 5, 7 y 9 PI (Cuadro 2).

Al determinar el patrón de secreción de IFN cada día PI con el ensayo del VENC, se observó que los títulos del grupo testigo sin infectar y los del día 7 PI no fueron estadísticamente diferentes entre sí, pero sí distintos ($p < 0.05$) al resto de los SN evaluados, los cuales no fueron diferentes entre ellos o con el grupo del IFN de referencia (Cuadro 2).

Al evaluar las dos técnicas de purificación de LT durante la infección primaria con *E. tenella*, se determinó que los títulos de IFN \log_2 del ensayo antiviral con el VENC a partir de los SN de linfocitos purificados por columnas de fibra de nilón fueron diferentes ($p < 0.05$) los días 1 y 5 PI, con respecto a los títulos de IFN \log_2 de los SN obtenidos de linfocitos purificados por gradientes de ficoll hypaque. Los títulos de IFN \log_2 determinados con el ensayo antiviral del VIBF a partir de los SN obtenidos con las dos técnicas de purificación no fueron diferentes ningún día PI con *E. tenella* ($p > 0.05$) (Figura 7).

3.3 Tercer estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)

Durante la infección secundaria con 50,000 ooquistes de *E. tenella* por ave con una sola inmunización previa de 10,000 ooquistes, se observó que los SN obtenidos de linfocitos purificados en columnas de fibra de nilón presentaron una cinética de producción de IFN mucho mayor a la observada en el grupo testigo de las aves sin infectar.

En la evaluación antiviral con el VIBF se determinó que el IFN se comenzó a elevar paulatinamente a partir del día 1 PI hasta el día 7 y 9 PI cuando fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) respecto a su grupo testigo sin desafiar (Figura 8).

En los resultados del ensayo antiviral con el VENC se observó un comportamiento similar los días 1 y 3 PI que fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a las lecturas del grupo testigo de aves no desafiadas, el patrón de secreción en este caso mostró un comportamiento diferente al observado en los experimentos anteriores ya que el título

presentado al día 7 PI aunque fue diferente estadísticamente ($p < 0.05$) al grupo testigo sin desafiar, el nivel de IFN mostró una tendencia a disminuir ese día, sin embargo posteriormente se elevó al día 9 PI, cuando fue significativamente diferente ($p < 0.05$) en relación al grupo testigo de aves sin desafiar (Figura 8).

Al determinar las diferencias entre los dos sistemas antivirales de cuantificación de IFN se observó que los títulos obtenidos con VIBF y los obtenidos con VENC fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) únicamente al día 1 PI (Figura 9).

En el análisis de la protección antiviral contra el VIBF por parte de los SN obtenidos durante los días posteriores a la inoculación secundaria con *E. tenella*, se determinó que los títulos obtenidos para el IFN de referencia y los títulos obtenidos todos los días PI con *E. tenella*, fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) con relación al observado en el grupo testigo sin desafiar (Cuadro 3).

Al analizar el patrón de actividad antiviral del IFN a través de los títulos obtenidos cada día PI con el ensayo del VENC, se determinó que los títulos obtenidos al día 1 y 3 PI fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a los observados en el grupo testigo sin desafiar y al obtenido el día 7 PI, estos últimos junto con el título determinado al día 9 PI fueron diferentes al título obtenido a partir del IFN de referencia. Los SN del día 9 PI no mostraron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en relación a cualquier otro grupo evaluado, a excepción del mostrado por el IFN de referencia (Cuadro 3).

3.4 Cuarto estudio experimental (evaluación de IFN en la respuesta secundaria)

En la evaluación de IFN de la infección secundaria ocasionada por *E. tenella* donde se empleó un programa de inmunización previa, con el ensayo antiviral del VENC se determinó una cinética de producción de IFN del grupo desafiado diferente ($p < 0.05$) a la cinética observada en el grupo testigo de aves sin infectar (Figura 10).

Al evaluar los títulos de los días PI de este modelo experimental con el ensayo antiviral donde se empleó el VIBF, no se halló diferencia estadística de los títulos de los SN de cada día PI del grupo desafiado con relación a los títulos observados para el grupo testigo sin desafiar. Los valores obtenidos con el ensayo del VENC fueron mayores que los determinados con el ensayo del VIBF (Figura 10).

Al comparar los dos sistemas antivirales de determinación de IFN se observó que únicamente a los días 1 y 7 PI, existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los títulos obtenidos con el VIBF y los títulos obtenidos con el VENC (Figura 11).

Al determinar el patrón de secreción de IFN cada día PI con *E. tenella*, se observó que el título obtenido con el ensayo del VIBF al día 3 PI no es estadísticamente diferente al título obtenido para el grupo testigo del IFN de referencia, ni respecto a los títulos obtenidos para el resto de los SN evaluados, mismos que difirieron ($p < 0.05$) solamente con el grupo del IFN de referencia (Cuadro 4).

Al evaluar con el ensayo del VENC el patrón de secreción de IFN cada día PI con *E. tenella*, se observó que los títulos de los días 7 y 9 PI no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.05$) al del grupo testigo sin infectar, el que a su vez difirió significativamente ($p < 0.05$) respecto a los SN obtenidos los días 1, 3 PI e IFN de referencia, los cuales no difirieron entre sí, ni con relación a los SN de los días 7 y 9 PI (Cuadro 4).

Producción de ooquistes de *E. tenella* en ciego.- Con la cámara de Neubauer se determinó que la cantidad de ooquistes en tejido cecal durante la infección primaria y secundaria, varió según el día de muestreo o el tipo de inmunización efectuada antes del desafío secundario con *E. tenella*. Al día 5 PI no existió diferencia entre cualquiera de los modelos de infección (Figura 12). Sin embargo, al día 7 PI la cantidad de ooquistes presentes en ciego durante la infección primaria mostró una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) en relación a la cantidad determinada en la infección secundaria normal o con el programa de refuerzo inmunológico (Cuadro 5).

En la evaluación efectuada al día 9 PI se determinó una mayor cantidad de ooquistes presentes en ciego en el modelo de infección primaria y secundaria normal, que fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a la cantidad observada en el modelo de desafío secundario con el programa de refuerzo antigénico (Figura 12) (Cuadro 5).

Cantidad de ooquistes de *E. tenella* en heces.- Con la cámara de McMaster se determinó que la cantidad de ooquistes presentes en heces al día 7 PI de la infección primaria fue mayor que la cantidad eliminada en cualquiera de los dos modelos experimentales de la

infección secundaria con *E. tenella* (Figura 13), se determinó una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre los dos tipos de infección (Cuadro 6).

Severidad de lesiones cecales en aves infectadas con *E. tenella*.- Utilizando la escala de Johnson y Reid (1970) el mayor grado en severidad de lesiones cecales se observó en el grupo del desafío primario que fue estadísticamente diferente a los dos grupos de desafío secundario ($p = 0.0023$). Además entre los dos grupos de desafío secundario también existió una diferencia altamente significativa ($p = 0.00057$) (Figura 14).

Ensayo antiviral con el VEV.- Debido a que las titulaciones del inóculo de VEV se realizaron en células VERO, este título no correspondió a la inducción de efecto citopático en FEP, por lo cual no se pudo evaluar el efecto protector de los SN.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

En la realización de las dos técnicas de aislamiento específico utilizadas en la presente investigación se obtuvo una pureza adecuada de la población de LT.

En el trabajo realizado por Breed *et al* (1997) se determinó que el efecto antiviral del IFN- γ presente en los SN obtenidos de linfocitos sanguíneos estimulados con Con-A después de una infección primaria con *E. tenella*, tiene aproximadamente el 90% de correlación con el aumento en producción de óxido nítrico (NO₂) de macrófagos activados con los mismos SN. Debido a que esta función es exclusiva del IFN- γ no se debe descartar su participación en la actividad antiviral observada en los ensayos efectuados en el presente estudio, esta función se expresó para efectos prácticos como actividad del IFN. De acuerdo al origen de su producción el IFN- γ es secretado principalmente por LT CD4+, LT CD8+ y LT con función NK. La actividad antiviral del IFN analizada en los cuatro estudios experimentales es atribuible principalmente al IFN- γ .

Revel (1979) y Rubinstein *et al* (1981) han indicado que el virus de la estomatitis vesicular (VEV) es el indicado para evaluar a través de ensayos antivirales la cantidad de IFN presente en SN de cultivos *in vitro* de fibroblastos o linfocitos. El VEV cuenta con características únicas de sensibilidad y especificidad en la detección de IFN. Sin embargo su utilización en México está restringida, ya que produce una enfermedad semejante a la fiebre aftosa, la cual no existe en nuestro país.

Todos los SN se evaluaron con el VEV para estandarizar los parámetros de medición de IFN con la finalidad de correlacionar los títulos obtenidos con los otros dos ensayos antivirales empleados en el presente estudio. Sin embargo, en el laboratorio donde se realizaron estas pruebas, el modelo se encuentra estandarizado para evaluar IFN de origen humano donde el título del inóculo en dosis infectantes se realiza con células VERO, por lo que al momento de correr esta prueba con FEP no existió efecto citopático. En toda evaluación futura con el VEV se recomienda efectuar la titulación en células filogenéticamente similares a las empleadas para la evaluación del IFN homólogo.

Existen otros virus probados en la evaluación de IFN, como los virus Sendai y SemLinki Forest (Rubinstein *et al*, 1981), sin embargo su utilización también está limitada

debido a las restricciones de importación al país de virus extranjeros, además estos virus no son de origen aviar.

Se recomienda evaluar la acción antiviral del IFN de ave con un virus aviar por especificidad de especie y valor metodológico. Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica sobre el empleo de virus aviares en modelos de detección de interferencia viral mediada por citocinas con énfasis en el IFN- γ , sin embargo, no se logró documentar la utilización del virus de la enfermedad de Newcastle o la del virus de la infección de la bolsa de Fabricio, ya que estos virus se han utilizado únicamente como métodos de replicación viral para la obtención de IFN (Gandhi *et al*, 1970; Lampson *et al*, 1974; Lomniczi *et al*, 1973; Wertz *et al*, 1994).

Los dos ensayos antivirales empleados como sistemas de detección de actividad antiviral utilizando un virus de ave para determinar IFN aviar dieron resultados positivos y satisfactorios en el presente estudio, ya que además de detectar cualitativamente la acción del IFN se pudo determinar cuantitativamente la producción de linfocitos aislados durante la infección experimental con *E. tenella*. Al inicio del presente estudio se planteó utilizar el VENC, un virus de cadena sencilla ARN que puede ser bloqueado adecuadamente por IFN- γ (Figura 2, esquema 1 y 2); sin embargo, por razones de confiabilidad se optó por utilizar un segundo virus de doble cadena ARN (VIBF) con la opción de poder inferir alguna diferencia en el mecanismo de acción del IFN presente durante la infección con *E. tenella*.

Durante la infección primaria, el patrón de secreción de IFN determinado por la actividad antiviral conferida a los FEP independientemente de la técnica de aislamiento de LT empleada se comportó de manera parecida. Sin embargo, al evaluar los SN con cualquiera de las dos técnicas antivirales se obtuvo un mayor título de IFN en los SN de linfocitos aislados con la técnica de ficoll hypaque en comparación a los SN de los linfocitos aislados con columnas de fibra de nilón.

Las cantidades obtenidas con ficoll fueron más altas de lo esperado, ya que con esta técnica se esperaba obtener un nivel más bajo de IFN, debido a que Weiler y Von Bülow (1987(b)) han reportado que los componentes del ficoll hypaque (polisucrosa, diatriozoato de sodio) son tóxicos para los LT y disminuyen su capacidad en la producción de citocinas. Otro factor potencial considerado en la baja producción de IFN de LT aislados con ficoll hypaque es la composición celular obtenida. Maheswaran y colaboradores (1975) han indicado que la respuesta hacia los mitógenos varía dependiendo de la composición

heterogénea del cultivo celular obtenida con ficoll hypaque. Shaefer y colaboradores (1985) mencionan que los monocitos no activados aislados con ficoll hypaque podrían ejercer una supresión sobre los LT estimulados y por lo mismo abatir la producción de citocinas. Lee *et al* (1978) y Onaga y Tajima (1983) mencionan una supresión del mismo tipo. Sin embargo, con el ensayo antiviral del VENC se detectó mayor actividad de IFN en las células aisladas con ficoll que la detectada en las células aisladas con columnas de fibra de nilón, hallazgo que concuerda con lo investigado por Kaspers *et al* (1994) quien indicó que la técnica de ficoll hypaque además de purificar inicialmente linfocitos puede tener un porcentaje importante de monocitos activados, los cuales podrían interrelacionar en una secreción dinámica de citocinas como TNF- α , TNF- β , IL-12 e IFN- γ con retroalimentación positiva. Esta situación se pudo deber también a algún tipo de interrelación con los LB los cuales con ficoll hypaque se hallan presentes en cantidades mayores a las obtenidas con la técnica de columnas de nilón (Kaspers *et al*, 1994).

La probable interrelación de los monocitos con los LT se evitó al incubar en cajas plásticas de Petri los cultivos celulares obtenidos de la interfase de ficoll, ya que los monocitos del bazo quedan adheridos al plástico y los LT en el SN. Sin embargo, quedó sin dilucidar la posibilidad de que en la interfase de ficoll hypaque existan otros tipos de células diferentes a los monocitos, las que podrían liberar otros tipos de citocinas con acción antiviral o bien interactuar con los LT (Onaga y Tajima, 1983).

Los ensayos antivirales efectuados con el VIBF se comportaron de manera parecida tanto en la determinación del perfil de secreción como en la cantidad de IFN detectada durante la respuesta primaria a *E. tenella*. Posiblemente se debió a que el IFN que inhibió los efectos citopáticos del VIBF, actuó en forma única y proporcionalmente en las dos técnicas de aislamiento (columnas y ficoll) sin interferencia de ninguna otra citocina. De acuerdo con lo expresado por Talebi y colaboradores (1995) esto posiblemente se debió a la acción de cantidades semejantes de IFN secretado por un número semejante de linfocitos estimulados con la misma cantidad de Con-A obtenidos a partir de las dos diferentes técnicas.

Se ha observado que los linfocitos cultivados *in vitro* mueren en pocas horas si no son estimulados específicamente con mitógenos como la fitohemaglutinina o la Con-A o con aloantígenos específicos de acuerdo a lo observado por Prowse y Pallister (1989) y Breed *et al* (1997). Sin embargo, con la finalidad de evitar cualquier factor de activación diferente a la previa estimulación *in vivo* con *E. tenella* se eligió la cantidad mínima de Con-A

(Maheswaran *et al*, 1975). Weiler y Von Bülow (1987(b)) determinaron que cantidades mayores a 7.5 µg de Con-A pueden enmascarar la estimulación previa *in vivo*, objetivo primordial con la finalidad de detectar actividad antiviral del IFN en los cuatro experimentos realizados, lo cual favorablemente se obtuvo, ya que se detectó un incremento de actividad del IFN sobre el nivel basal determinado en linfocitos de aves no desafiadas pero sí estimuladas con Con-A, ya que se obtuvieron respuestas de interferencia viral tanto en linfocitos de aves desafiadas como en linfocitos de aves no desafiadas.

La selección de la concentración mínima de Con-A fue adecuada de acuerdo a lo reportado por Prowse y Pallister (1989) quienes obtuvieron resultados semejantes al utilizar 2 µg de Con-A y conforme también a lo indicado por Weiler y Von Bülow (1987(b)) quienes observaron que cantidades mayores a 10 µg de Con-A pueden saturar la capacidad de respuesta en la liberación de citocinas. Sin embargo, en relación a la estimulación y a la pureza del cultivo lo que se ha determinado es que a altas concentraciones la Con-A puede activar a los LT sin necesidad de que existan células de coestimulación (Miggiano *et al*, 1976). Knudtson y colaboradores (1990) han mostrado que el control genético en la proliferación de LT debida a la Con-A es independiente al control genético del mismo efecto por citocinas de otras células coestimuladoras (IL-2). De acuerdo a Breed *et al* (1997) y Prowse y Pallister (1989) todos los linfocitos aislados de bazo o de sangre responden a la Con-A proliferando, pero únicamente los linfocitos estimulados previamente *in vivo* con *E. tenella* son los que producen IFN.

La densidad celular elegida para los cultivos de linfocitos (5×10^6 células/mL) permitió tener flexibilidad en cuanto a la cantidad de linfocitos aportados por ave a diferentes edades, puesto que la concentración de 1×10^7 células/mL que se halla indicada por Kogut *et al* (1992), Prowse y Pallister (1989), Téllez *et al* (1993) y Weiler y Von Bülow (1987(b)) para cultivos de linfocitos esplénicos individuales a partir de aves menores de tres semanas presentó dificultades para su obtención. La elección efectuada por estos investigadores se realizó con la finalidad de obtener mayor cantidad de SN, por lo que utilizaron aves mayores a las tres semanas o bien efectuaron mezclas celulares provenientes de varias aves. Weiler y Von Bülow (1987(b)) indicaron que a una cantidad mayor de 1×10^7 células/mL, no es necesario ningún tipo de mitógeno en la estimulación de linfocitos para la producción de citocinas, sin embargo, Prowse y Pallister (1989) han observado que a densidades mayores de 1×10^7 células/mL los linfocitos no producen IFN. De acuerdo con

los resultados obtenidos en el presente estudio y los obtenidos por Prowse y Pallister (1989) la elección para densidad celular fue adecuada.

En cuanto a la influencia de aloantígenos celulares, se determinó que el mezclar diferentes poblaciones de linfocitos provenientes de distintas aves no tuvo ningún efecto sobre el incremento en la producción de IFN, en comparación al IFN producido por los cultivos individuales realizados en el segundo experimento, los que mostraron mayor actividad de IFN detectada por los dos ensayos antivirales.

En los estudios de Dunnigton *et al* (1992) y Brake *et al* (1997) determinaron que la respuesta de anticuerpos contra *E. tenella* y la respuesta al desafío de dos líneas de aves moderadamente resistentes es independiente del haplotipo de MHC que poseen, al contrario de lo explicado por Abbas *et al* (1994) quien reporta una fuerte respuesta de estimulación y liberación de linfocinas en cultivos mixtos de linfocitos con diferente haplotipo de MHC clase I.

Es posible que debido a la alta consanguinidad existente en las líneas sintéticas de pollo de engorda, una gran proporción de las aves sean homocigóticas para el haplotipo de MHC clase I y II, lo cual podría explicar en parte la menor respuesta en la protección antiviral del IFN observada en el primer experimento (Bumstead *et al*, 1995). Se debe recordar que el cruce de las líneas genéticas hembra y macho utilizadas en el presente estudio (Hubbard x Hubbard) posiblemente tienen un alto grado de consanguinidad. En el futuro no se debe descartar la posibilidad de realizar investigaciones que involucren cultivos mixtos de linfocitos con diferente haplotipo.

La utilización de aloantígenos parasitarios en la estimulación específica de LT para la producción de IFN ha dado resultados positivos. Sin embargo, aún no se comprenden claramente los mecanismos de respuesta involucrados a nivel celular. Prowse y Pallister (1989) determinaron que algunos antígenos solubles de *E. acervulina* estimulan a linfocitos sensibilizados *in vivo* contra *E. tenella* y propusieron un tipo de reacción cruzada; sin embargo, Martín y colaboradores (1993) encontraron que no existe respuesta de estimulación cruzada, por lo cual, hasta que se determine cómo los aloantígenos parasitarios inducen una respuesta de IFN por parte de los linfocitos es recomendable seguir trabajando con mitógenos a concentraciones mínimas (Con-A, PHA) como auxiliares en la estimulación complementaria a LT sensibilizados previamente *in vivo*.

Al comparar el ensayo antiviral del VIBF con el del VENC se observó que aunque difirieron en sus lecturas principalmente al principio de la infección primaria, en general se comportaron de manera semejante, como se observó durante la infección primaria en el pico de IFN mostrado al día 5 PI, la caída de actividad de IFN al día 7 PI y su recuperación al día 9 PI (Figuras 3 y 5).

Una diferencia notoria determinada en los SN obtenidos de linfocitos purificados con columnas de fibra de nilón del primer experimento, es que los niveles de IFN bloquearon más al VIBF que al VENC. Mientras que en el segundo experimento donde los linfocitos fueron purificados con gradientes de ficoll hypaque los niveles de IFN bloquearon más al VENC que al VIBF. Las diferencias en respuesta hacia el IFN presente en un mismo SN se podrían deber de acuerdo a lo propuesto por Stryer (1991) a una falta de sensibilidad por parte de los mecanismos de respuesta intracelular de la célula huésped (FEP) a la acción del bloqueo inducido por el IFN y al tipo de ARN de cada virus empleado (cadena sencilla (VENC) o doble (VIBF))(Figura 2, Esquema 1 y 2). Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que esta diferencia se puede deber al patrón de citocinas secretadas al principio de la infección, aunque la acción que mejor se manifestó se puede atribuir principalmente al IFN- γ .

Cuando se trabaja con SN crudos no se debe descartar la acción de otras citocinas como TNF- α que bajo determinadas circunstancias podría mostrar mayor o menor sensibilidad respecto a cualquiera de los dos virus. Byrnes *et al* (1993(b)) determinó que durante la infección con *E. tenella* existe un pico de producción de TNF- α alrededor del día 3 PI, después cae y alrededor del día 10-14 PI se eleva para presentar un segundo pico de TNF- α , por lo que sugirió que el primer pico se debe a la respuesta inespecífica de tipo inflamatoria y el segundo pico a una respuesta de tipo inmune. El primer pico de TNF- α curiosamente se da dos días antes del pico de IFN detectado en el primer y segundo experimento del presente trabajo, lo que posiblemente indica que la liberación de TNF- α actúa como inmunomodulador de la respuesta de IFN- γ precediéndolo en presentación 2 a 3 días, lo que sugiere que estas dos citocinas están interrelacionadas estrechamente en la defensa primaria contra *E. tenella* y posiblemente también durante la respuesta inmune. Los niveles de IFN detectados al día 9 PI en la respuesta primaria tienden a elevarse y debido a que el periodo de muestreo no fue más amplio no se pudo detectar un segundo pico de IFN que posiblemente podría correlacionarse con el segundo pico de TNF- α observado por Byrnes *et al* (1993(b)). En futuras investigaciones se sugiere prolongar el periodo de detección de IFN, utilizar un virus de referencia como el VEV y estandarizar su título en

cultivos de FEP. Otra explicación para la diferencia entre los dos ensayos antivirales de acuerdo a lo estudiado por Fenner (1974), es que posiblemente existe una distinta capacidad de virulencia para invadir el monoestrato de FEP por parte de cada virus. Una consideración más podría deberse a la calificación visual del efecto citopático de cada uno de los virus.

Un punto importante que debe considerarse de acuerdo a lo planteado por Kasper *et al* (1994), Stinson *et al* (1978) y Yang y Rabinovsky (1987) es el atribuible a la metodología empleada, debido al diferente grado de participación que tienen las columnas de fibra de nilón y el ficoll hypaque sobre la obtención, purificación y porcentaje de participación de los linfocitos NK en los cultivos de LT para la obtención de los SN. Se debe recordar que los LT NK son productores de IFN- γ , de allí su importancia en este tipo de estudios donde debido a las características particulares de cada técnica de purificación se pudo contribuir a que hubiera un menor o mayor número de LT con acción NK. Sin embargo, no se puede inferir mucho al respecto ya que aún faltan por estudiar los mecanismos inmunes precisos de la interrelación entre LT CD4+, CD8+ y LT NK. Se debe considerar que Herberman y colaboradores (1982) determinaron un papel de citotoxicidad importante por parte de los LT NK al ser estimulados con IFN- γ . Sin embargo, no se puede descartar por completo una probable participación de los LT NK en los resultados obtenidos en el presente estudio.

En humanos y murinos, Grossberg (1987) ha reportado una posible acción antiviral por parte del TNF- α . En el presente estudio se aumentó a 72 horas el tiempo de incubación de los LT estimulados con Con-A, en lugar de las 48 horas determinadas como óptimas por Prowse y Pallister (1989) y Weiler y Von Bülow (1987(b)) con la finalidad de obtener SN con un mayor contenido de IFN- γ y así evitar una probable interferencia del TNF- α . Se ha determinado que la producción de TNF- α en cultivos mixtos de linfocitos de mamífero es durante las primeras 12 horas de incubación *in vitro*, las siguientes horas de incubación el TNF- α es catabolizado al tiempo que es sustituido por la secreción de TNF- β , que junto con la IL-12 actúan como citocinas coestimuladoras en la producción de IFN- γ , con esta modificación se intentó asegurar en el presente estudio una mejor evaluación proporcional de la inhibición viral por parte del IFN- γ . Además, de acuerdo a lo reportado por Paul (1993) la mayor cantidad de TNF- α es producida por macrófagos, los cuales con la metodología de aislamiento y purificación de LT del primer estudio hubo en menor cantidad (>4 % macrófagos). Aunque no se descarta una participación mayor de los macrófagos en el

segundo trabajo experimental con gradientes de ficoll hypaque, no se debe olvidar que una buena parte de ellos se eliminaron mediante la incubación en placas plásticas de Petri.

De acuerdo con los trabajos de estandarización de Prowse y Pallister (1989) durante la infección primaria del presente estudio existió producción de IFN por parte de LT de aves no desafiadas pero sí estimuladas con Con-A. La producción de IFN se comportó uniforme a lo largo de los 9 días de evaluación y ayudó a determinar un nivel basal, el cual se empleó de referencia y permitió hallar diferencias significativas en relación al patrón de secreción de IFN por parte de los LT de aves desafiadas con *E. tenella*. Aunque Prowse y Pallister (1989) no pudieron detectar diferencias en la producción de IFN de LT de aves infectadas y no infectadas hasta el día 35 PI, en la presente investigación se logró detectar IFN a partir del primer día PI. La razón por la cual Prowse y Pallister (1989) no pudieron detectar diferencias en la producción de IFN al principio de la infección probablemente se debió a que utilizaron dosis bajas y repetidas de ooquistes esporulados de una cepa de *E. tenella*, la cual en base a su comportamiento posiblemente era moderadamente patógena.

Debido a que *E. tenella* es menos inmunógena que *E. acervulina* (Long *et al*, 1986; Nakai *et al*, 1992) es factible que las dosis bajas en las que se suministró al principio de la evaluación no hallan estimulado adecuadamente al sistema inmune de las aves hasta después del día 35 PI, cuando la infección coccidiana posiblemente se amplificó por multiplicación autoinfectante y por lo tanto hubo mayor respuesta de IFN.

Con la finalidad de evitar esta situación en la presente investigación se utilizaron inóculos de una cepa altamente patógena de *E. tenella* y un mayor número de ooquistes esporulados (10,000). La severidad de lesiones obtenidas (Figura 14) y el número de ooquistes presentes en tejido cecal y heces (Figuras 12 y 13) determinaron la patogenicidad de la cepa de *E. tenella* utilizada en el presente estudio. En una investigación reciente Breed *et al* (1997) con una dosis única de 1000 ooquistes esporulados de *E. tenella* logró detectar actividad de IFN- γ desde el día 8 PI.

Con las dos técnicas de separación de linfocitos esplénicos utilizadas en los dos experimentos iniciales, se observó una elevación gradual de IFN del día 1 PI hasta el nivel más alto obtenido el día 5 PI. Sin embargo, difirió con lo observado por Breed y colaboradores (1997) quienes con linfocitos de sangre periférica determinaron el nivel más

alto de IFN al día 8 PI. Breed y colaboradores (1996) correlacionaron el aumento de IFN del día 8 PI al aumento de LT CD8+ observado en sangre el mismo día.

El nivel de IFN determinado en la respuesta primaria bajó abruptamente al día 7 PI. Los títulos de los SN de linfocitos purificados con gradientes de ficoll hypaque este día (7 PI) no difirieron con el nivel basal de IFN establecido para el grupo testigo. La misma situación se observó con los SN de los linfocitos purificados con columnas de fibra de nilón, que aún cuando sus títulos de IFN difirieron respecto a los del grupo testigo, si fue aparente una baja de nivel de IFN (Figuras 5 y 8). Aunque esta diferencia entre técnicas de aislamiento al día 7 PI se podría deber a la presencia de macrófago productores de TNF- α , lo cual ayudaría a explicar la diferencia respecto al nivel basal, esto únicamente sucedería en el experimento donde se utilizó ficoll hypaque, sin embargo la diferencia ocurrió en el experimento con columnas de fibra de nilón donde supuestamente hubo menos macrófagos.

En investigaciones futuras es necesario determinar el porcentaje de LT con función NK aislados con la técnica de gradientes de ficoll hypaque y el porcentaje de los aislados con la técnica de columnas de fibra de nilón, ya que el porcentaje de participación de estas células podría ayudar a explicar esta diferencia. Otra explicación sería el grado de interacción existente entre LB y LT, que mientras con la técnica de columnas de fibra de nilón los LB son eliminados en gran cantidad, en la técnica de ficoll hypaque esto no sucede (Stimson *et al*, 1978).

Paul (1993) determinó que los LB se estimulan mucho menos con Con-A que los LT, si embargo Knudtson *et al* (1990) indicó que los LB podrían alterar el patrón de secreción de citocinas de los LT, a través de su propio patrón de liberación de citocinas, lo cual podría explicar en parte las diferencias observadas entre las dos técnicas.

La baja del nivel de actividad del IFN al día 7 posiblemente se debió al origen de las células evaluadas. En el trabajo de Breed y colaboradores (1997) efectuado con linfocitos de sangre periférica, el nivel de actividad antiviral al día 8 PI fue el más alto, comenzó a descender al día 10 PI y llegó a un nivel menor el día 14 PI donde no difirió respecto al testigo no desafiado. Esto posiblemente se relaciona con los hallazgos realizados un año antes (Breed *et al*, 1996) donde se determinó un decremento de LT CD4+ los días 9-10 PI con *E. tenella*. Al equiparar los resultados de Breed y colaboradores (1997) con los hallazgos del presente trabajo, se infiere que podría haber existido un incremento de LT

CD8+ alrededor del día 4-5 PI, un decremento de LT CD4+ al día 7 PI y una recuperación posterior de estas subpoblaciones al día 9 PI con un ligero aumento de IFN para este día.

Una diferencia importante en el tiempo de presentación de la máxima producción de IFN entre el trabajo de Breed *et al* (1997) y el descrito para los dos primeros experimentos, se debió posiblemente al mayor o menor grado de resistencia a la infección con *E. tenella* por parte de las aves empleadas, en los trabajos de Breed *et al* (1997) se utilizaron aves Leghorn que posiblemente difieren en el grado de resistencia a la infección en comparación a la línea de pollo de engorda empleada en la presente investigación (Hubbard x Hubbard).

En ratones de una línea resistente a coccidia (Balb/c) se observó que al infectarlos con *E. vermiformis* se obtiene una rápida respuesta en la producción de IFN- γ al día 4 o 5 PI (Ovington *et al*, 1995) (Rose *et al*, 1991(b)), la cual declina después de esta fecha; mientras que en una línea susceptible (C57BL/6) el pico de producción de IFN- γ se presenta hasta el día 9 PI cuando difiere con el nivel obtenido en la línea resistente. Los autores infieren que el rápido incremento en la producción de IFN- γ se relaciona con una mayor resistencia en los ratones resistentes (Balb/c) caracterizada por una infección más benigna a diferencia de la observada en los ratones susceptibles (C57BL/6).

Se requiere realizar mayor investigación en las aves para verificar si realmente esta rápida respuesta de IFN al día 5 PI se puede o no deber a una mayor resistencia a la infección con *E. tenella* en pollo de engorda y su relación con una respuesta tardía de IFN al día 8 PI en aves ligeras (Leghorn) posiblemente menos resistentes a la infección (Breed *et al*, 1997). De acuerdo a Giambrone y Jonhson (1984) la evaluación de resistencia se puede efectuar por medio de calificación de lesiones y el grado de susceptibilidad por medio de pérdida de peso durante la infección, características que no sean han evaluado en ningún trabajo sobre determinación de IFN aviar. En futuras investigaciones deberán considerarse.

Los linfocitos utilizados en el presente trabajo fueron de origen esplénico por lo que es posible que a medida que se manifiestan los efectos detrimentales del periodo de patencia de la infección por *E. tenella* (más o menos al día 7 PI), los LT CD8+, una subpoblación específica de linfocitos T, podría estar estimulada en los tejidos linfoides del intestino (Lillehoj y Trout, 1994).

Breed y colaboradores (1996) determinaron un incremento transitorio de LT con expresión CD8+ (subpoblaciones: Dim+ y Brigh+) en sangre, esto posiblemente indicaría

que existe liberación de citocinas quimiotácticas hacia el sitio de infección, que ocasiona subsecuentemente que los LT CD4+, LT CD8+ e inclusive LT NK que proliferaron a lo largo del ciclo asexual del parásito, en el momento que existe esta quimiotaxis tienden a migrar hacia lamina propia o epitelio del intestino. Al evaluar el IFN al día 7 PI con la cantidad de linfocitos esplénicos contemplada en el diseño experimental, éstos probablemente forman parte de la población de linfocitos que aún cuando se hallan en proliferación no se han estimulado al 100 % como para producir linfocinas y/o migrar hacia el sitio de infección. Dijkmans *et al* (1990) reportó que el aumento en la proliferación de LT no se encuentra correlacionado con el aumento de secreción de una citocina en particular.

El mecanismo propuesto es complejo ya que al estimular quimiotácticamente a los LT CD8+ de bazo éstos comienzan a estimularse autocrinamente al tiempo que inician la migración, con lo que posiblemente se explicaría el incremento de IFN por parte de los LT CD8+ al día 8 PI (Breed *et al*, 1997). Sin embargo, también es posible que al migrar estimulen secundariamente a otras células de defensa como macrófagos, heterófilos y linfocitos, específicamente LT CD4+ y LT CD8+ presentes en otros tejidos linfoides como bazo, timo, bolsa de fabricio, médula ósea o bien a partir de la sangre.

Para despejar estas dudas sería conveniente correlacionar la producción de IFN de LT de sangre, bazo, timo y otros órganos linfoides que se han utilizado en las distintas metodologías de cultivo celular con la cantidad de IFN producida en intestino, sin embargo esto no se ha podido efectuar debido a las dificultades técnicas que involucra el cultivo de LT a partir del intestino.

Kogut y Slajchert (1992) y Ovigton *et al* (1995) han sugerido que las citocinas secretadas en el sitio de la infección tienen únicamente alcance local. Sin embargo, existen otras citocinas como IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β y GM-CSF que pueden tener acción sobre sus células blanco en todo el organismo, lo que depende del curso de la enfermedad y del patrón de secreción de citocinas presente.

Una posible explicación para la baja de IFN observada al día 7 PI en los dos primeros experimentos es que al día 6 y 7 PI con *E. tenella* cuando ocurre la mayor cantidad de lesiones en el tejido cecal es factible que los LT CD8+ activados de origen esplénico productores de citocinas como el IFN- γ , se encuentren en migración hacia el tejido cecal, según se deduce de los trabajos efectuados por Lawn y Rose (1982) y Vervelde *et al* (1996), y de acuerdo a los trabajos realizados por Lillehoj y Trout (1993,1996), Trout y Lillehoj (1993,1995) y Rose y Heskett (1992) se ha determinado que existe una acción

inmunodpresora por parte de *E. tenella*, que posiblemente se debe a una invasión activa de los esporozoitos de *E. tenella* a LT CD8+ y macrófagos, principalmente durante la infección primaria. El incremento de IFN observado al día 9 PI con *E. tenella* de la infección primaria se debe posiblemente a una recuperación de las subpoblaciones de LT CD8+ debida a la acción de la IL-2 secretada por LT CD4+ + de todo el organismo incluidos los del bazo. Sin embargo, se debe considerar que el incremento en la producción de IFN es independiente de la proliferación de los LT CD8+ conforme a lo observado en los experimentos realizados por Kaspers *et al* (1994) y Martín *et al* (1994).

Al evaluar la respuesta secundaria con el modelo de inmunización previa única de 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* a los 20 días de edad y un desafío con 50,000 ooquistes 14 días después, se observó un comportamiento ligeramente diferente en el patrón de secreción de IFN, lo cual aunque se podría deber a las diferencias entre los ensayos antivirales anteriormente analizadas durante la respuesta primaria, también se pudo deber a diferencias en la infectividad de los virus empleados o bien presentar una respuesta diferente a otras citocinas presentes en los SN evaluados.

Con el ensayo del VENC al día 1-3 PI se detectó un incremento de IFN diferente al determinado con el VIBF. El IFN detectado con el VENC disminuyó al final del periodo de evaluación, lo que se podría atribuir a que el día 1 y 3 PI existen subpoblaciones de LT CD4+ y LTCD8+ que aún se hallan estimulados por el desafío al día 20 de edad. Es posible que al día 6-7 PI estos linfocitos migren hacia el intestino en respuesta al segundo desafío de 50,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*, por lo que es posible que al día 6-7 días PI no se haya logrado detectar un mayor nivel que el detectado los primeros días de la evaluación .

Se debe considerar que los tipos de respuesta secundaria a una infección por *E. tenella* se han estudiado poco. Por ejemplo Breed *et al* (1997) sugiere que el comportamiento de la producción de IFN es semejante al patrón de secreción observado durante una infección primaria, sin embargo aún no se ha reportado ningún resultado al respecto. De acuerdo a los trabajos preliminares de Breed *et al* (1997) la respuesta secundaria al desafío con *E. tenella* consistiría en una elevación gradual del IFN del día 1 PI hasta el día 8 PI, lo cual no coincide con lo observado en el comportamiento de la respuesta secundaria del tercer experimento del presente trabajo. Sin embargo, aunque al principio de la evaluación los resultados obtenidos en el tercer experimento manifestaron diferencias en los perfiles de secreción de

IFN, en general se comportaron de manera semejante al perfil observado en la respuesta primaria de los dos primeros experimentos (Figuras 3 y 5).

Donde mejor se observó este comportamiento fue en el perfil determinado con el VIBF, el cual mostró un patrón de liberación semejante al de una respuesta primaria, sin embargo, este difirió al día 1-3 PI. El alto nivel de IFN al principio de la evaluación de la respuesta secundaria posiblemente se debió a la existencia de un estímulo de forma continua previo al segundo desafío.

En cuanto a cantidad, los niveles de IFN del tercer experimento son similares a los obtenidos en el segundo experimento (Figura 5) y mucho más altos que los obtenidos en el primero (Figura 8). Sin embargo, no se debe olvidar que la técnica utilizada para el aislamiento de los linfocitos fue la misma que se empleó en el primer experimento, por lo cual se determinó que existe una elevación más rápida y alta de los niveles de IFN durante una respuesta secundaria que durante una respuesta primaria.

Debido a que el tipo de aves empleadas en el presente estudio es diferente al utilizado por otros autores, hubo diferencias y coincidencias en la respuesta secundaria analizada en el tercer experimento en relación a otras investigaciones. Por ejemplo, Martín *et al* (1994) al estudiar la respuesta de aves congénitas al haplotipo de MHC y aves Leghorn heterocigóticas al MHC con un diseño experimental semejante al empleado en el tercer estudio experimental, con un desafío previo con ooquistes de *E. acervulina* y un desafío 15 días después con mayor cantidad de ooquistes, encontró que la cantidad de IFN producida por un cultivo de la mezcla de linfocitos de tres aves distintas fue diferente al día 6 PI de la respuesta primaria en comparación a la cantidad determinada al día 6 PI de la respuesta secundaria. Por ejemplo la línea Leghorn SC con haplotipo homocigótico (B^2B^2) tuvo una respuesta mucho mayor al desafío primario que al desafío secundario, a diferencia de otras líneas de aves homocigóticas 151₅-7.5 (B^2B^2) 151₅-15 ($B^{15}B^{15}$) y heterocigóticas TK ($B^{15}B^{21}$) que aunque variaron en la magnitud de sus respuestas, la producción de IFN total en la respuesta secundaria fue mayor que en la primaria y se comportó en forma parecida a los resultados obtenidos en el tercer experimento de la presente investigación.

En los resultados del tercer experimento al igual que en los obtenidos por Martín *et al* (1994) se observó una diferencia respecto a lo observado por Giambrone y Johnson (1984) quienes determinaron que la respuesta de los linfocitos a la Con-A después de una infección con *Eimeria spp* es independiente del haplotipo de MHC que posean y que éste no influye sobre la respuesta inmune celular después del desafío con *Eimeria spp*. Por lo tanto la cruza

de la línea de pollo de engorda (Hubbard x Hubbard) utilizada en los cuatro experimentos del presente trabajo, independientemente de la conformación de su haplotipo para el MHC se comportó sin variaciones atribuidas a una posible influencia alogénica, que de existir fue mínima, como se observó en la cantidad de IFN al día 7 PI de la respuesta secundaria, donde la línea empleada en el presente trabajo se comportó de manera semejante a tres de las cuatro líneas de aves estudiadas por Martín *et al* (1994).

El perfil de secreción determinado al final de la evaluación del tercer experimento (día 9 PI, Figura 8) tendió a una recuperación, la cual posiblemente se debió a un efecto compensatorio post-infección, caracterizado por estimulación y proliferación de LT en todos los órganos linfoides del organismo, semejante al que se observó al final de la evaluación de la respuesta primaria (Figuras 3 y 5).

En el modelo de la respuesta secundaria con refuerzo inmunológico el nivel de IFN determinado con el ensayo del VENC mostró un perfil semejante al determinado en la respuesta secundaria del tercer experimento, con una notable diferencia en la cantidad de interferencia viral al principio de la evaluación (días 1 y 3 PI) la cual posteriormente los dos últimos días del muestreo descendió de manera similar al IFN determinado en el tercer experimento. El alto nivel detectado al principio de este perfil posiblemente se debió a que el ave mantiene en circulación y en diferentes órganos linfoides secundarios una subpoblación de LT específicos activados, que al recibir un estímulo antigénico como es la infección de los esporozoitos a las células epiteliales, debido al corto periodo (10 días) de la última inmunización (1,000 ooquistes esporulados) pueden en determinado momento producir una amplia variedad de linfocinas quimiotácticas e inmunorreguladoras.

Para el caso específico de la población linfocitaria esplénica evaluada se tiene que considerar que aún 10 días después de la última inmunización dentro del programa de inmunización por refuerzo antigénico puede existir un estímulo continuo, al cual posiblemente se debe el nivel idéntico de IFN observado al principio de la evaluación.

Posteriormente al día cuatro cuando existe el efecto traumático de la ruptura celular ocasionado por la liberación de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*, es factible que haya un estímulo aún no definido que induce a migrar a los linfocitos activados a partir de los diferentes órganos linfoides secundarios hacia el intestino, por lo cual más tarde se observa baja en la actividad de IFN de los LT esplénicos evaluados.

Se necesita considerar que no existen trabajos de investigación que correlacionen los eventos dinámicos de migración linfocitaria de los distintos órganos linfoides secundarios hacia sangre y posteriormente hacia el intestino. Por lo cual es necesario realizar una investigación que correlacione en el mismo momento del muestreo después de la inoculación con *E. tenella* las subpoblaciones celulares presentes en bazo, timo y sangre con las subpoblaciones presentes en intestino.

Se observó que los niveles detectados con el VIBF aunque no difirieron respecto a los niveles del VENC a excepción del día 1 y 7 PI (Figura 11) si mostraron un nivel bajo de IFN, que posiblemente se debió a las diferencias de sensibilidad entre los dos bioensayos.

Los perfiles obtenidos con el VENC fueron similares en los dos experimentos de respuesta secundaria, sin embargo el perfil de secreción obtenido en el cuarto experimento con el VIBF se comportó de manera muy diferente respecto al perfil determinado en el tercer experimento, lo cual posiblemente se debió a las diferencias en reacción a la presencia de distintas cantidades de IFN dentro de cada uno de los dos diferentes modelos de respuesta secundaria o bien a una inadecuada apreciación visual del efecto citopático en la evaluación del cuarto experimento, debida a la interferencia visual inducida por un posible efecto tóxico ocasionado por las citocinas presentes en los SN evaluados.

En la mayoría de trabajos donde se evalúan SN provenientes de LT estimulados *in vitro* con Con-A por medio de ensayos antivirales con FEP no se reportan efectos tóxicos de las citocinas sobre los FEP, sin embargo, es factible que éstos existan. En la evaluación antiviral de los cuatro experimentos este efecto se observó en las primeras diluciones de los SN, sin embargo interfirió poco con la evaluación visual del efecto citopático inducido por los virus utilizados.

Este efecto se observó en mayor cantidad cuando se realizaron trabajos preliminares de evaluación antiviral con el VIBF utilizando sobrenadantes crudos de linfocinas concentradas (membranas de ultraconcentración Amikon YM-10) provenientes de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis* (SE-ILK) (Téllez *et al*, 1993) o *E. tenella* (ET-ILK) (Kogut *et al*, 1988; Kogut y Slajchert, 1992). El efecto tóxico más evidente en la evaluación de estos SN crudos fue un desprendimiento casi total de la monocapa celular a las 24 horas de depositados los SN (datos no mostrados).

En la presente evaluación este efecto se redujo notablemente debido a la decisión de evaluar únicamente SN sin concentrar. Este efecto se debió posiblemente a que al estimular con un mitógeno a diferentes poblaciones celulares *in vitro* existe un incremento en la

secreción de diferentes citocinas que de acuerdo a Byrnes *et al* (1993(b)) pueden inducir un efecto tóxico severo, entre las principales citocinas reportadas se encuentran el TNF- α y la IL-1, que de acuerdo a la investigación realizada por Byrnes *et al* (1993(b)) se producen al principio de la infección con *E. tenella* y posiblemente tengan efecto tóxico.

Dijkmans *et al* (1989) determinó que una alta cantidad de IFN induce efectos tóxicos severos sobre fibroblastos de ratón, los que se amplificaron con pequeñas cantidades de IL-1 y TNF- α , por lo cual el efecto tóxico observado en los ensayos antivirales se debe posiblemente a una interacción sinérgica.

Johnson *et al* (1994) ha reportado que cuando se aplican terapéuticamente cantidades de IFN- γ mayores a las de una reacción inmunológica normal, se observan efectos adversos y detrimentales.

La técnica de conteo de ooquistes en ciegos con la cámara de Neubauer durante la respuesta primaria y secundaria a *E. tenella* permitió realizar un análisis adecuado de este parámetro. En la respuesta primaria se detectó una gran cantidad de ooquistes presentes en tejido cecal, que de acuerdo a la estandarización de Juárez *et al* (1997(b)) y Kao y Ungart (1994) permitió diferenciar este tipo de respuesta con el de una respuesta secundaria.

En la respuesta secundaria del tercer experimento con una dosis única de 10,000 ooquistes al día 20 de edad, no se observó presencia de ooquistes al día 7 PI, sin embargo al día 9 PI se observa una eliminación de ooquistes semejante a la cantidad observada para la respuesta primaria, lo que posiblemente se debió al retraso en el periodo de patencia ocasionado por la inmunización parcial inducida al día 20 de edad. Otra razón para explicar el retraso en la aparición de ooquistes de acuerdo a lo reportado por Conway *et al* (1993), Giambrone *et al* (1980,1981) y Leathem y Burns (1968) es que *E. tenella* es un mal inmunógeno, ya que un solo desafío con gran cantidad de ooquistes induce un estado de inmunidad inadecuado en comparación a un programa de inmunización de ooquistes con bajas cantidades, el cual como se observó en los conteos realizados a partir de ciegos y heces (Figura 12 y 13) si indujo una buena inmunidad, la que se caracterizó por una nula eliminación de ooquistes. En cambio en la respuesta secundaria con una única inmunización, aunque la cantidad de ooquistes eliminados se reduce significativamente en relación a la respuesta primaria, esta es más alta que la detectada en el programa de refuerzo, lo cual coincide con los resultados de Joiner y Norton (1976), Long *et al* (1976(b)), Nakai *et al* (1992) y Stiff y Bafundo (1993).

Una observación análoga se reporta para la calificación de lesiones, donde como era de esperarse las aves de la respuesta primaria fueron las que mayor grado en severidad de lesiones mostraron. Sin embargo, el grupo del tercer experimento presentó un mayor grado de lesiones con respecto al presentado por el grupo del cuarto experimento, donde la severidad de lesiones fue nula, lo cual posiblemente se debió al programa de refuerzo utilizado en comparación al desafío único empleado en el tercer experimento.

Los parámetros de conteo de ooquistes y calificación de lesiones utilizados en el presente estudio para evaluar el grado de infectividad con *E. tenella* en cada uno de los modelos de infección estudiados son altamente recomendables, ya que reflejaron adecuadamente el grado de inmunidad establecido por cada modelo infectivo.

En investigaciones futuras se recomienda contar con reactivos de origen aviar que se consideren estándares como: sistemas de evaluación antiviral idénticos, ensayos de estimulación de macrófagos semejantes, AcM contra citocinas recombinantes específicas de ave, aves transgénicas a estas citocinas recombinantes, aves de líneas idénticas, cepas virales de referencia internacional, protocolos de inoculación semejantes etc. Para evitar diferencias entre las técnicas y los reactivos que se han empleado para evaluar el comportamiento del IFN- γ aviar durante la infección por *Eimeria spp.* Un punto de partida importante dentro de esta metodología es la obtención de IFN- γ recombinante, el equipo de investigación de Shultz *et al* (1995) ha reportado contar con esta citocina recombinante desde 1994, sin embargo sus hallazgos, aunque semejantes a los reportados por Dijkmans *et al* (1990), no se pueden considerar concluyentes debido a que el IFN recombinante obtenido posee una capacidad antiviral excelente, sin embargo no estimula macrófagos, por lo que es posible se trate de IFN tipo I (α, β).

Un método alternativo que presenta nuevas perspectivas para eliminar factores de confusión y que posiblemente se podría aplicar en modelos aviares es el propuesto por Ovington *et al* (1995), el que consiste en la medición directa de IFN- γ a partir de los tejidos intestinales donde se efectúa la infección.

Aunque los mecanismos que median la patogénesis de la infección por *E. tenella* o los que median la inmunidad contra la misma aún no se determinan precisamente, este trabajo aporta una nueva perspectiva en el comportamiento de secreción de IFN durante una infección primaria y secundaria con *E. tenella*.

Una perspectiva de investigación en la consecución de objetivos más ambiciosos dentro del estudio del IFN- γ es complementar la presente investigación con la evaluación de

los SN obtenidos en los cuatro experimentos sobre su capacidad de estimular y activar a macrófagos aviares, acción considerada exclusiva para el IFN- γ .

Además en el laboratorio donde se efectuaron estos estudios se necesita contar con una estandarización internacional en UI/g, ya que es prioritario ajustar esta estandarización a los ensayos antivirales de futuras investigaciones. Otra perspectiva de trabajo es la obtención propia de IFN de referencia.

Aunque en las condiciones experimentales de los ensayos de carácter biológico no es factible extraer una conclusión con carácter irrefutable debido a las condiciones de alta variabilidad inherentes al continuo cambio de la materia viva. En el contexto de la investigación y bajo las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo se desprenden una serie de apreciaciones que se pueden considerar concluyentes:

- La inoculación con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* al pollo de engorda de 21 días de edad permite detectar cantidades altas de IFN tan pronto como a las 72 horas PI.
- La elevación de la actividad del IFN de LT esplénicos al día 5 PI de la infección primaria con *E. tenella* se encuentra relacionada con un grado mayor de resistencia a las infecciones coccidianas en pollo de engorda.
- La baja de actividad del IFN secretado por los LT esplénicos al día 7 PI de la infección primaria esta relacionada estrechamente con el daño tisular ocasionado por la ruptura celular y la liberación de los oocistos de *E. tenella* en pollo de engorda.
- La elevación de actividad del IFN de los LT esplénicos al día 9 PI durante la infección primaria con *E. tenella* se encuentra relacionada con la recuperación del tejido intestinal del pollo de engorda.
- Después de la infección secundaria con *E. tenella* en pollo de engorda, los niveles de IFN de los LT esplénicos al día 1 y 3 PI se hallan más elevados que los niveles observados durante la infección primaria.
- El grado de aplicabilidad de los ensayos antivirales *in vitro* utilizando el VENC y el VIBF para la detección de IFN aviar es adecuado.

CAPÍTULO 5

LITERATURA CITADA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Celular and Molecular Immunology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Press, 1994.

Agarwal SK, Cloud SS, Burnside J. Interferon activity of mitogen-induced chicken splenic lymphocytes which do not express interferon mRNA. *Vet Immunol and Immunopathol* 1996;53:269-275.

Adair BM, McNeilly F, McConnell CDG, Todd D, Nelson RT, McNulty MS. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis* 1991;35:783-792.

Bafundo KW, Jeffers TK. Selection for resistance to monensin, nicarbazin, and the monensin plus nicarbazin combination. *Poul Sci* 1990;69:1485-1490.

Bafundo KW. Aplicación práctica de vacunas con ooquistes vivos en la avicultura comercial. *Memorias del VIII Seminario InteARNcional de Patología Aviar.* 1994 Junio 6-10; Athens (Georgia) EUA. Athens (Georgia): Universidad de Athens Georgia y AMEVEA, 1994:287-296.

Bauer RM, Olsen RG. Parameters of production and partial characterization of feline interleukin-2. *Vet Immunol and Immunopathol* 1988;19:173-183.

Barcinski MA, Costa-Moreira ME. Cellular response of protozoan parasites to host-derived cytokines. *Parasitology Today* 1994;10:352-355.

Barrón RBL, Cruz LM, Doval UR, García BP, Guzmán CH, López BPE, Ramírez HA, Vales MN, Zavala GJ. Manual de prácticas del laboratorio de Virología. México DF: Departamento de Microbiología Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, 1989.

Brake DA, Fedor CH, Werner BW, Miller TJ, Taylor RL, Clare RA. Characterization of Immune response to *Eimeria tenella* antigens in a natural immunity model with hosts which differ serologically at the B locus of the major histocompatibility complex. *Infect and Immun* 1997;65:1204-1210.

Breed DGJ, Dorrestein J, Vermeulen AN. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis* 1996;40:37-48.

Breed DGJ, Dorrestein J, Schetters TPM, Waart LVD, Rijke E, Vermeulen AN. Peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens produce gamma-interferon after stimulation *in vitro*. *Parasite Immunology* 1997;19:127-135.

Brugh JM. A simple method for recording and analyzing serological data. *Avian Dis* 1978;22:362-365.

Bumstead M, Bumstead N, Rothwell L, TomLey FM. Comparison of immune responses in inbred lines of chickens to *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella*. *Parasitology* 1995;111:143-151.

Byrnes S, Emerson K, Kogut M. Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony-stimulating factors and interferon. *Immun and Med Microbiol* 1993;6:45-52.(a)

Byrnes S, Eaton R, Kogut M. *In vitro* interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *Inter J for Parasitol* 1993;23:639-645.(b)

Castañón CJA. Comportamiento de un aislamiento velogénico del virus de la enfermedad de Newcastle en cultivos celulares (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1974.

Cabrales JJ, Quintana LJ, Casaubon HM, Juárez EM, Petrone VM. Respuesta Inmune en la coccidiosis aviar. Memorias de la VI Jornada Médico Avícola; 1997 marzo 12-14; Ciudad Universitaria (DF) México. México (DF): DPA:Aves, ANECA, División de educación Continua FMVZ-UNAM, 1997:123-127.

Chapman HD. *Eimeria tenella*: experimental development of resistance to monensin in the chicken. Parasitology 1984;89:9-16.(a)

Chapman HD. Drug resistance in avian coccidia (a review). Veterinary Parasitology 1984;15:11-27.(b)

Conway DP, Sasai K, Gaafar SM, Smothers CD. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. Avian Dis 1993;37:118-123.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevack EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. Vol. 1 New York USA: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1992.

Czuprynski CJ, Henson PM, Campbell PA. Enhanced accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages by transfer of T cell from mice immunized with *Listeria monocytogenes*. J Immunol 1985;134:3449-3454.

Czuprynski CJ, Brown JF. Recombinant murine interleukin-1 alfa enhancement of nonespecific antibacterial resistance. Infec and Immunol 1987;55:2061-2065.

Czuprynski CJ, Brown JF, Young KM, Cooley AJ, Kurtz RS. Effects of murine recombinant interleukin 1 on the host response to bacterial infection. J Immunol 1988;140:962-968.

Delannoy I, Lekeux P, Miossec P. Cytokine and anti-cytokine strategies in inflammatory reaction modulation. Vet Res 1993;24:449-467.

Dijkmans R, Decock N, Heremans H, Van Damme J, Billiau A. Interferon- γ is cytotoxic for normal mouse fibroblasts: enhancement by necrosis factor and interleukin-1. *Lymphokine Res* 1989;8:25-34.

Dijkmans R, Creemers J, Billiau A. Chicken macrofage activation by interferon: do birds lack the molecular homologue of mammalian interferon- γ ?. *Vet Immun and Immunopathol* 1990;26:319-332.

Dunnigton EA, Groos WB, Martin A, Siegel PB. Response to *Eimeria tenella* of chicken selected for high or low antibody response and differing in haplotypes at the major histocompatibility complex. *Avian Dis* 1992;36:49-53.

Eckman MK. Horizontal vs. vertical health programs in broiler production. *Poultry Digest* 1993; August:16-22.

Engelhard VH. How cells process antigens. *Scient Am* 1994;271:44-51.

Fenner F. The biology of animal viruses. Interference and interferon. 2th ed. New York: Academic Press, 1974.

Feng HM, Popov VL, Walker DH. Depletion of gamma interferon and tumor necrosis alpha in mice with *Rickettsia conorii*-infected endothelium: impairment of rickettsicidal nitric oxide production resulting in fatal, overwhelming rickettsial disease. *Infect and Immun* 1994;62:1952-1960.

Gandhi SS, Burke DC, Scholtissek C. Virus RNA synthesis by ultraviolet-irradiated Newcastle disease virus and Interferon production. *J gen Virol* 1970;9:97-99.

García EG. Inmunoprofilaxis y caracterización parcial de linfocinas en la protección de la coccidiosis aviar (tesis de maestría) México (DF) México: División de estudios de Posgrado e Investigación de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, 1995.

Gerrard TL, Dyer DR, Zoon KC, Nedden DZ, Siegel JP. Modulation of class I and class II histocompatibility antigens on human T cell lines by IFN- γ . *J Immunol* 1988;140:3450-3455.

Giambrone JJ, Klesius PH, Edgar SA. Avian coccidiosis: evidence for a cell-mediated immune response. *Poult Sci* 1980;59:38-43.

Giambrone JJ, Klesius PH, Eckman MK, Edgar SA. Influence of hormonal and chemical bursectomy on the development of acquired immunity to coccidia in broiler chickens. *Poult Sci* 1981;60:2612-2618.

Giambrone JJ, Johnson LW. Development of cell-mediated immunity and resistance to clinical coccidiosis infection in chickens selected for resistance and susceptibility to *Eimeria tenella*. *Poult Sci* 1984;63:2162-2166.

Gill JL. Design and Analysis of Experiments in the Animal and Medical Sciences. Vol. 1 Ames Iowa USA: The Iowa State University Press, 1978.

Gómez VG. Identificación de linfocinas en sobrenadante de linfoblastos de pollo estimulados con concanavalina A (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.

Grossberg SE. Interferon: an overview of their biological and biochemical properties. In: Pfeffer LM, editor. Mechanism of Interferon Inducers Actions. Vol.I. USA: CRC Press, 1987.

Herberman RB, Ortaldo JR, Mantovani A, Hobbs DS, Kung HF, Pestka S. Effect of human recombinant interferon on cytotoxic activity of natural killer (NK) cells and monocytes. *Cell Immunol* 1982;67:160-167.

Hodgson JN. Coccidiosis: oocyst counting technique for coccidiostat evaluation. *Ex Parasitol* 1970;28:30-36.

Isobe T, Lillehoj HS. Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances disease susceptibility to *Eimeria mivati* infection. *Vet Immunol and Immunopathol* 1993;39:431-446.

Ito Y, Nagai Y, Maeno K. Interferon production in mouse spleen cells and mouse fibroblasts (L cells) stimulated by various strains of Newcastle disease virus. *J gen Virol* 1982;62:349-352.

Jeffers TK, Bentley EJ. Experimental development of monensin resistance in *Eimeria meleagridis*. *Poult Sci* 1980;59:1731-1735.

Jenkins MC, Augustine PC, Danforth HD, Barta JR. X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s). *Infect and Immun* 1991;59:4042-4048.

Jeurissen SHM, Janse EM, Vermeulen AN, Vervelde L. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite interaction. *Vet Immunol and Immunopathol* 1996;54:231-238.

Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol* 1970; 28:30-36.

Johnson HM, Bazer FW, Szente BE, Jarpe MA. How interferons fight disease. *Scient Am* 1994;270:40-47.

Joyner LP, Norton CC. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitol* 1976; 72:115-125.

Juárez EMA. Evaluación de la respuesta serológica de tres vacunas emulsionadas del virus de la enfermedad de Newcastle en el campo y nivel de protección ante un desafío con una cepa de alta patogenicidad bajo condiciones controladas en pollo de engorda (tesis de licenciatura) México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.

Juárez EMA. Perspectivas de la aplicación de la citometría de flujo en el diagnóstico avícola. Memorias de la XXII Convención anual ANECA; 1997 mayo 7-11; Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1997:323-328.(a)

Juárez EMA, Cabriales JJ, Petrone VM, Méndez A, Hernández VX, Téllez IG. Validación del conteo total de oocistos de *Eimeria tenella* efectuado con hemocitómetro y cámara de McMaster. Memorias de la XXIII Convención anual ANECA: 1998 Mayo 6-9; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1998:106-110.

Juárez EMA, Cabriales JJ, Téllez IG, Petrone VM. Evaluación del conteo total de oocistos de *Eimeria tenella* con las cámaras de Neubauer y McMaster en muestras obtenidas bajo condiciones controladas. Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Avicultura: 1997 Septiembre 23-26; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Latinoamericana de Avicultura, 1997: 35-39.(b)

Juárez EMA, Ceniceros RM, Téllez IG, García EG, Paasch ML. Utilización de la citometría de flujo en la investigación inmunológica aviar. Memorias de la XXI Convención anual ANECA; Proceedings of the forty-fifth western poultry disease conference; 1996 mayo 1-5; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, WPDC, 1996:351-354.

Juárez EMA, 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; Ciudad Universitaria (DF) México. México (DF): DPA:Aves, ANECA, División de Educación Continua FMVZ-UNAM, 1997:128-136.(c)

Julius MH, Simpson E, Herzenberg A. A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. Eur J Immunol 1973;3:645-653.

Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. Infect and Immun 1989;57:609-615.

Kao TC, Ungart BLP. Comparison of sequential, random, and hemacytometer methods for counting *Cryptosporidium* oocysts. *J Parasitol* 1994;80:816-819.

Kaspers B, Lillehoj HS, Jenkins MC, Pharr GT. Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. *Vet Immunol and Immunopathol* 1994;44: 71-84.

Klasing KC. Avian leukocytic cytokines. *Poult Sci* 1994; 73:1035-1043.

Klesius PH, Giambone JJ. Adoptive transfer of delayed hypersensitivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derived transfer factor. *Poult Sci* 1984;63:1333-1337.

Knudtson KL, Kaiser MG, Lamont SJ. Genetic control of interleukin-2-like activity is distinct from that of mitogen response in chickens. *Poult Sci* 1990;69:65-71.

Kohase M, Moriya H, Sato T, Kohno S, Yamazaki S. Purification and characterization of chick interferon induced by viruses. *J gen Virol* 1986;67:215-218.

Kogut MH, Lange C. Recombinant interferon- γ inhibits cell invasion by *Eimeria tenella*. *J Interf Res* 1989;9:67-77.(a)

Kogut MH, Lange C. Interferon- γ -mediated inhibition of the development of *Eimeria tenella* in cultured cells. *J Parasitol* 1989;75:313-317.(b)

Kogut MH, Slajchert T, Scott HM, Lange C. Protection of chicken from infection with *Eimeria tenella* following the *in vivo* administration of immune lymphokines. *Poult Sci* 1988;67: Suppl. 1, pp 105.

Kogut MH, Slajchert T. T-lymphocytes confer protection in chicken against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. *Immunol and Infect Dis* 1992;2: 69-79.

Lampson GP, Tytell AA, Nemes NN, Hilleman LT. Purification and characterization of chick embryo interferon. *J gen Virol* 1974;23:232-238.

Lawn AM, Rose ME. Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J Parasitol* 1982;68:1117-1123.

Leathem WD, Burns WC. Duration of acquired immunity of the chicken to *Eimeria tenella* infection. *J Parasitol* 1968;54:227-232.

Lee LF, Sharma JM, Nazerian K, Witter RL. Suppression of mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens inoculated with Marek's disease virus. *J Immunol* 1978;120:1554-1559.

Leiby DA, Schreiber RD, Nacy CA. IFN- γ produced *in vivo* during the first two days is critical for resolution of murine *Leishmania major* infections. *Microbial Pathogenesis* 1993;14:495-500.

Leong KH, Ramsay AJ, Boyle DB, Ramshaw IA. Selective induction of immune responses by cytokines coexpressed in recombinant Fowlpox virus. *J of Virol* 1994;68:8125-8130.

Lillehoj HS. Immune response during coccidiosis in SC and FP chickens. I. In vitro assessment of T-cell proliferation response to stage-specific parasite antigens. *Vet Immunol and Immunopathol* 1986;13:321-330.

Lillehoj HS. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect Immun* 1987;55:1616-1621.

Lillehoj HS. Role of gut-associated lymphoid tissues in local immunity to enteric pathogens in chickens. 39th Annual Meeting Symposium Program of Enteric Disease Control; 1996 July 21; Louisville (KY) USA: American Association of Avian Pathologists, 1996:22-27.(a)

Lillehoj HS, Bacon LD. Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge infection with *Eimeria acervulina*. *Avian Dis* 1991;35:294-301.

Lillehoj HS, Chung KS. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. *Vet Immunol and Immunopathol* 1992;31:347-360.

Lillehoj HS, Kang SY, Keller L, Sevoian M. *Eimeria tenella* and *E. acervulina*: lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma and sporozoite-stimulates immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. *Exp Parasitol* 1989;69:54-64.

Lillehoj HS, Trout JM. Coccidia a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol* 1993;22:3-31.

Lillehoj HS, Trout JM. CD8+ T cell-coccidia interactions. *Parasitology Today* 1994;10:124-127.

Lillehoj HS, Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Annual Microbiol Rev* 1996;9:349-360.(b)

Lockhart RZ Jr. Criteria for acceptance of a viral inhibitor as an Interferon and a general description of the biological properties of Know Interferons. In: *Interferons and Interferon Inducers*. Amsterdam Netherlands: Elsevier Publishing Co, 1973:11-27.

Lomniczi B. Studies on interferon production and interferon sensitivity of different strains of Newcastle disease virus. *J gen Virol* 1973;21:305-313.

Long PL, Johnson J, Mckenzie ME, Perry E, Crane Norton CC. The immunity arising from continous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitol* 1976; 72:115-125.

Long, PL, Johnson J, McKenzie ME, Perry E, Crane MS, Murray PK. Immunisation of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Pathol* 1986;15:271-278.

Long PL, Millard BJ, Joyner LP, CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina* 1976;VI:201-217.

Long PL, Milne BS. The effect of an interferon inducer on *Eimeria maxima* in the chicken. *Parasitology* 1971;62:295-302.

Long PL, Rowell JG. Counting oocysts of chicken coccidia. *Lab Pract* 1958;7:515 - 519.

Luginbuke RC, Schlotzhaver SD. SAS/STAT guide for personal computers. 6th. edi. USA: SAS Institute Cary, NC, 1987:555 - 573.

McDougal RL. Testigo de la coccidiosis en el siglo XXI. Memorias del VIII Seminario InteARNcional de Patología Aviar. 1994 Junio 6-10; Athens (Georgia) USA. Athens (Georgia): Universidad de Athens Georgia y AMEVEA, 1994:277-284.

McDougal RL, Reid MW. Coccidiosis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr HW, editors. *Diseases of Poultry*. 9 th. Ames Iowa USA: Iowa State University Press, 1991:780-787 .

McGruder ED, Ramírez GA, Kogut MH, Moore RW, Corrier DE, Deloach JR, Hargis BM. In ovo administration of *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines confers protection to neonatal chicks against *Salmonella enteritidis* organ infectivity. *Poult Sci* 1995;74:18-25.

McGruder, E.D., Ray, P.M., Téllez, I.G., Kogut, M.H., Corrier, D.E., Deloach, J.R. and Hargis, B.M. *Salmonella enteritidis* immune leucocyte-stimulated soluble factors. Effects on increased to *Salmonella* organ invasion in day-old leghorn chicks. *Poult Sci* 1993;73:2264-2271.

Maheswaran SK, Thies ES, Greimann C. A micromethod for evaluating turkey lymphocyte responses to phytomitogens. *Am J Vet Res* 1975;9:1397-1400.

Martín A, Awadalla S, Lillehoj HS. Characterization of cell-mediated responses to *Eimeria acervulina* antigens. *Avian Dis*. 1995;39:538-547.

Martín A, Lillehoj HS, Kaspers B, Bacon LD. Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection. *Poult Sci* 1993;72:2084-2094.

Martín A, Lillehoj HS, Kaspers B, Bacon LD. Mitogen-induced lymphocyte proliferation and interferon production following coccidia infection. *Avian Dis* 1994;38:262-268.

Miggiano V, North M, Buder A, Pink JRL. Genetic control of the response of chicken leukocytes to a T-cell mitogen. *Nature* 1976;263:61-63.

Myers TJ, Lillehoj HS, Fetterer RH. Partial purification and characterization of chicken interleukin-2. *Vet Immunol and Immunopathol* 1992;34:97-114.

Moreno DR. Pruebas preliminares de inmunización contra la coccidiosis de las aves. Memorias de IX Convención anual ANECA; 1984 mayo 6-8; Guanajuato (Guanajuato) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1984:16-26.

Moreno DR. Ventajas del empleo de la vacuna contra la coccidiosis de las gallinas. Memorias de IX Congreso Latinoamericano de Avicultura; XXIV Congreso Nacional de Avicultura X Convención anual ANECA; 1985 mayo 4-7; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1985:639-644.

Moreno DR. Enfermedades parasitarias de las aves, Tomo II. 2a edición. México DF: Fac de Med Vet y Zoot SUA, Universidad Nacional Autónoma de México, 1989.

Moreno DR, Quiroz RH, Mosqueda TA. Patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. *Rev Vet Méx* 1980;2:1-7.

Nacional Institute of Allergy and Infectious Diseases, World Health Organization. Interferon nomenclature. *Nature* 1980;286:110.

Nakai Y, Uchida T, Kanazawa K. Immunization of young chickens by tryckle infection with *Eimeria tenella*. *Avian Dis* 1992;36:1034-1036.

Onaga H, Tajima M. Activation of macrophages by culture fluid of antigen stimulated spleen cells collected from chickens immunized with *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol* 1983;13:1-11.

Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and immunological control of *Eimeria spp.* *Int J Parasitol* 1995;25:1331-1351.

Paul WE. *Fundamental Immunology*. Third Ed. New York USA: Raven press, Ltd, 1993.

Petrone VM, Casaubon MT, Juárez MA, Ledesma MN, Cabriales J, Del Río JC. Inflamación e Inmunología celular en aves. Memorias de la VI Jornada Médico Avícola; 1997 marzo 12-14; Ciudad Universitaria (DF) México. México (DF): DPA:Aves, ANECA, División de Educación Continua FMVZ-UNAM, 1997:117-122.

Pierce AE, Long PL. Studies on acquired immunity to coccidiosis in bursaless and thymectomized fowls. *Immunology* 1965;9: 427-439.

Prowse SJ, Pallister J. Interferon release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. *Avian Pathol* 1989;16:439-442.

Revel M. Molecular mechanism involved in the antiviral effects of interferon. In: I Gresser I, editor. *Interferon 1*. New York USA: Academic Press, Inc, 1979:101-163.

Richman DD, Wong KT, Robinson WS, Merigan TC. Effect of interferon on the replication of Sendai virus. *J gen Virol* 1970;9:141-150.

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Third edition. USA: Edi. mosby, 1993.

Rose ME, Hesketh P. Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasite Immunol* 1982;54:171-185.

Rose ME, Hesketh P, Ogilvie BM. Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response in rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. *Immunology* 1979;36:71-79.

Rose ME, Hesketh P, Wakelin D. Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. *Parasitology* 1992;105:349-354.

Rose ME, Lawn AM, Millard BJ. The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken. *Parasitology* 1984;88:199-210.

Rose ME, Smith AL, Wakelin D. Gamma interferon-mediated inhibition of *Eimeria verniformis* growth in cultured fibroblast and epithelial cells. *Infect Immun* 1991;59:580-586.(a)

Rose ME, Wakelin D. Mechanisms of immunity to coccidiosis. In: Yvone P, editor. *Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs*. Tours France: Proceedings of the 5^o International Coccidiosis Conference, 1989:527-540.

Rose ME, Wakelin D, Hesketh P. Interferon-gamma mediated effects upon immunity to coccidial infections in the mouse. *Parasitol Immunol* 1991;13:63-74.(b)

Rothwell L, Gramzinski RA, Rose ME, Kaiser P. Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Parasite Immunol* 1995;17:525-533.

Rubinstein S, Familleti PC, Pestka S. Convenient assay for interferons. *J of Virol* 1981;37:755-758.

Sambhara SR, Belden EL. Bovine interleukine-2: production and characterization. *Vet Immunol and Immunopathol* 1988; 18:165-172.

Schaefer AE, Scafuri AR, Fredericksen TL, Gilmour DG. Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken peripheral blood leukocytes. *J Immunol* 1985;135:1652-1660.

Scott P. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991;147:3149-3155.

Sekellick MJ, Marcus PI. Induction of high titer chicken interferon. *Methods Enzymol* 1986; 119:115-125.

Sharma JM. Avian cellular immunology. Boca Raton Boston Ann Arbor: CRC Press, Inc, 1991.

Shat KA. Cell-mediated immune effector functions in chickens. *Poult Sci* 1994;73:1077-1081.

Shat KA, Purchase HG. Cell-culture methods. In: Purchase HG, editor. *Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Pennsylvania USA: American Association of Avian Pathologists, 1989:167-175

Sheaff ET, Meager A, Burke DC. Factors involved in the production of interferon by inactivated Newcastle disease virus. *J gen Virol* 1972;17:163-175.

Shofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, Nussenzweig V. γ -interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 1987;330:664-666.

Shultz U, Kaspers B, Rinderle C, Sekellick MJ, Marcus PI, Staeheli P. Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor activity. *Eur J Immunol* 1995;25:847-851.

Stiff MI, Bafundo KW. Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria* Sp. *Avian Dis* 1993;37:295-301.

Stinson RE, McCorkle F, Glick B. Nylon wool column separation of chicken thymic-derived (T) and bursal-derived (B) lymphocytes. *Poult Sci* 1978;57:518-525.

Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due secretion of different cytokine patterns. *FASEB J* 1991;5:171-177.

Stryer L. Bioquímica. T. II, Tercera edición. Barcelona España: Reverte SA, 1991.

Suzuki Y, Orelfibra MA, Shreiber RD, Remington JS. Interferon- γ The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.

Talebi A, Mulcahy G. Cross-reactivity among antisera raised against five avian *Eimeria* species in the natural host and in rabbits. *Avian Pathol* 1995;24:533-544.(a)

Talebi A, Torgerson PR, Mulcahy G. Optimal conditions for measurement of blastogenic responses of chickens to concanavalin A in whole blood assays. *Vet Immunol and Immunopathol* 1995;46:293-301.(b)

Tellez IG, Kogut MH, Hargis MB. Immunoprophylaxis of *Salmonella enteritidis* infections by lymphokines in leghorn chicks. *Avian Dis* 1993;37:1062-1070.

Trout JM, Lillehoj HS. Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites. *J Parasitol* 1993;79:790-792.

Trout JM, Lillehoj HS. *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poult Sci* 1995;74:1117-1125.

Trout JM, Lillehoj HS. T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet Immunol and Immunopathol* 1996;53:163-172.

Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Vet Microbiol* 1995;45:93-119.

Vervelde L, Vermeulen AN, Jeurissen SHM. In *situ* characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunol* 1996;18:247-256.

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

Weiler H, Von Bülow V. Detection of different macrophage-activating factor and interferon activities in supernatants of chicken lymphocyte cultures. *Avian Pathol* 1987;16:439-452. (a)

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

Wertz K, Büttner M, Mayr A, Kaaden OR. More than one component of the Newcastle disease virus particle is capable of interferon induction. *Vet Microbiol* 1994;39:299-311.

Wietzerbin J, Stefanos S, Falcoff R, Lucero M, Catinot L, Falcoff E. Immune interferon induced by phytohemagglutinin in nude mouse spleen cells. *Infect and Immun* 1978;21:966-972.

Wilson K, Grenfell BT. Generalized linear modelling for parasitologists. *Parasitology Today* 1997;13:33-38.

Witter RL, Hunt HD. Poultry vaccines of the future. *Poult Sci* 1994;73:1087-1093.

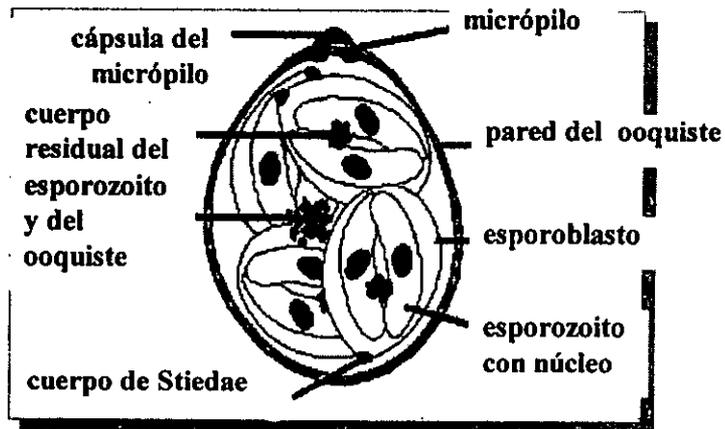
Wong GR. Evaluación de las linfocinas obtenidas de aves inmunizadas con *Salmonella enteritidis* en la inmunoprolifaxis contra la infección de *S. gallinarum* en pollos de engorda (tesis de Licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1994.

Zar J. *Bioestadistical analysis*. Third ed. Englewood Cliffs New Jersey: ed. Prentice Hall Inc, 1996:348-351.

FIGURA 1

ESQUEMA 1

Ooquiste esporulado de *Eimeria tenella*
forma infectante



ESQUEMA 2

Ciclo reproductivo de *Eimeria tenella*

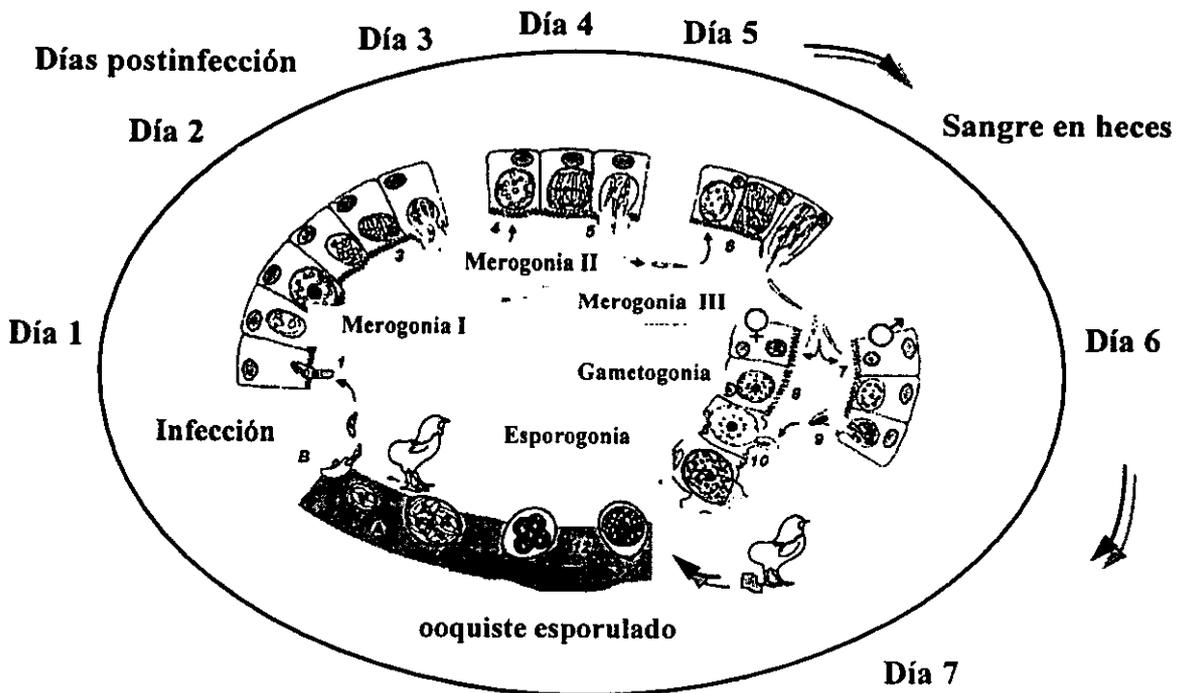
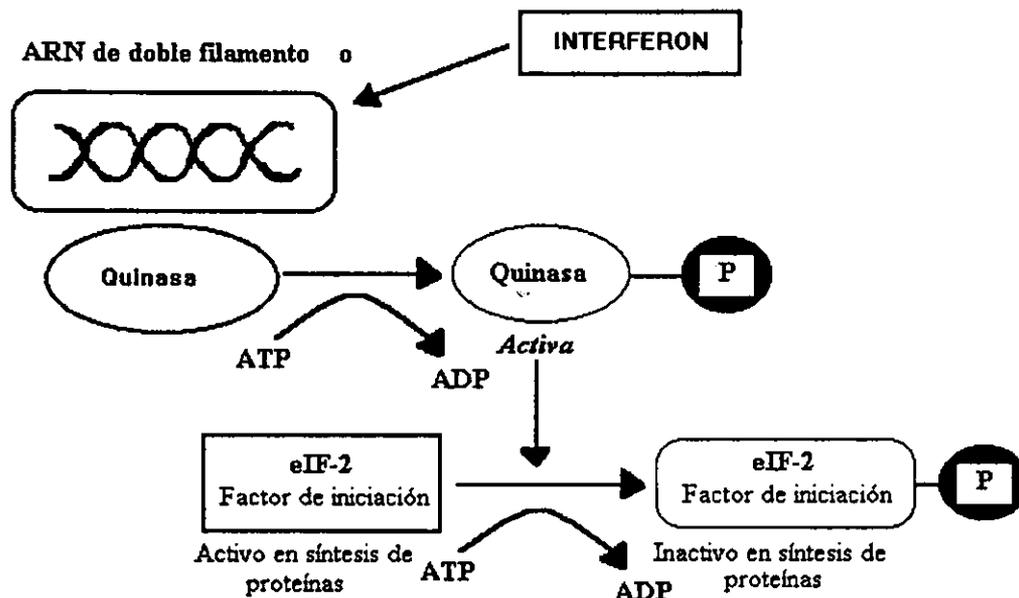


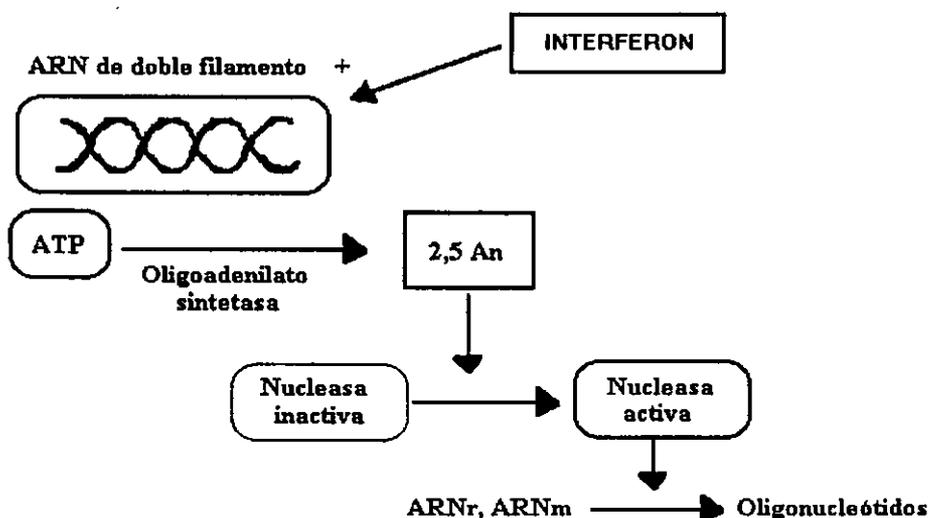
FIGURA 2

ESQUEMA 1



El interferón y el ARN de doble filamento activan a la quinasa que inhibe a la subunidad alfa del eIF-2 que es el factor iniciador del ARNt en la subunidad ribosómica 40 S e inhibe la traducción y síntesis de proteínas.

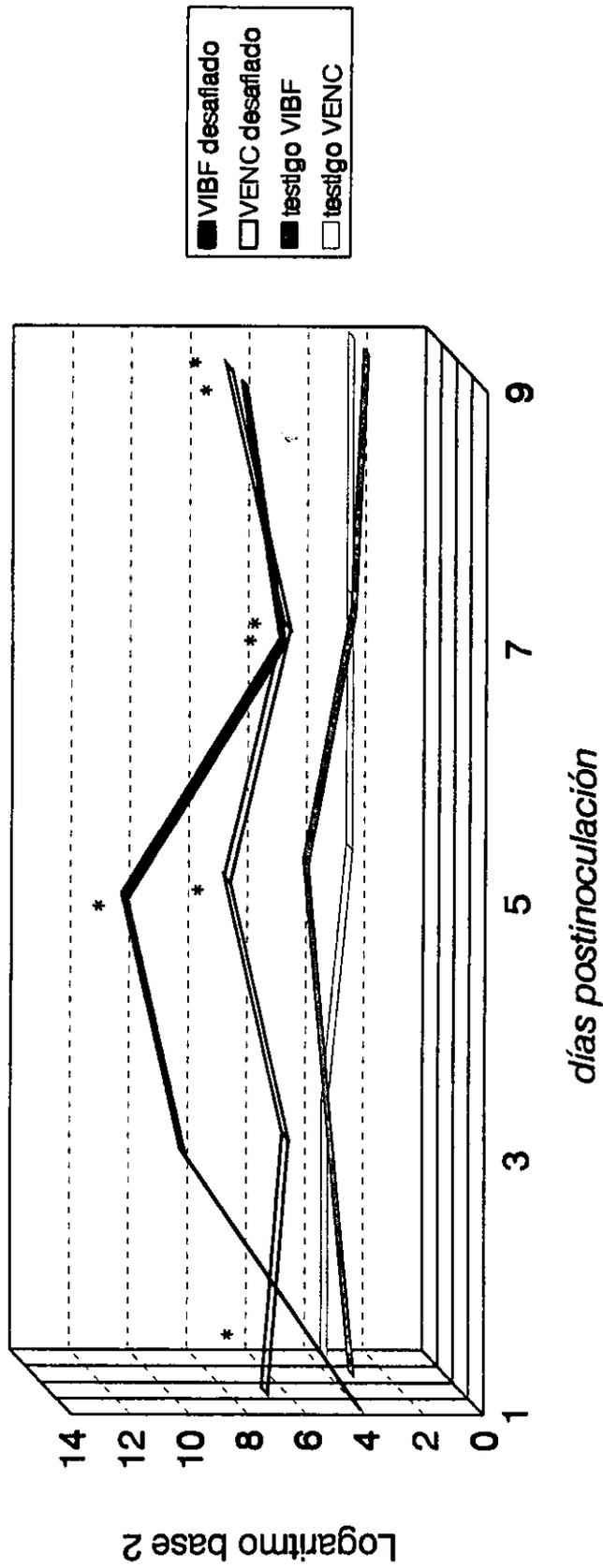
ESQUEMA 2



El ARN de doble filamento estimula la degradación del ARNr y ARNm e inhibe la iniciación de la síntesis proteica en las células tratadas con interferón

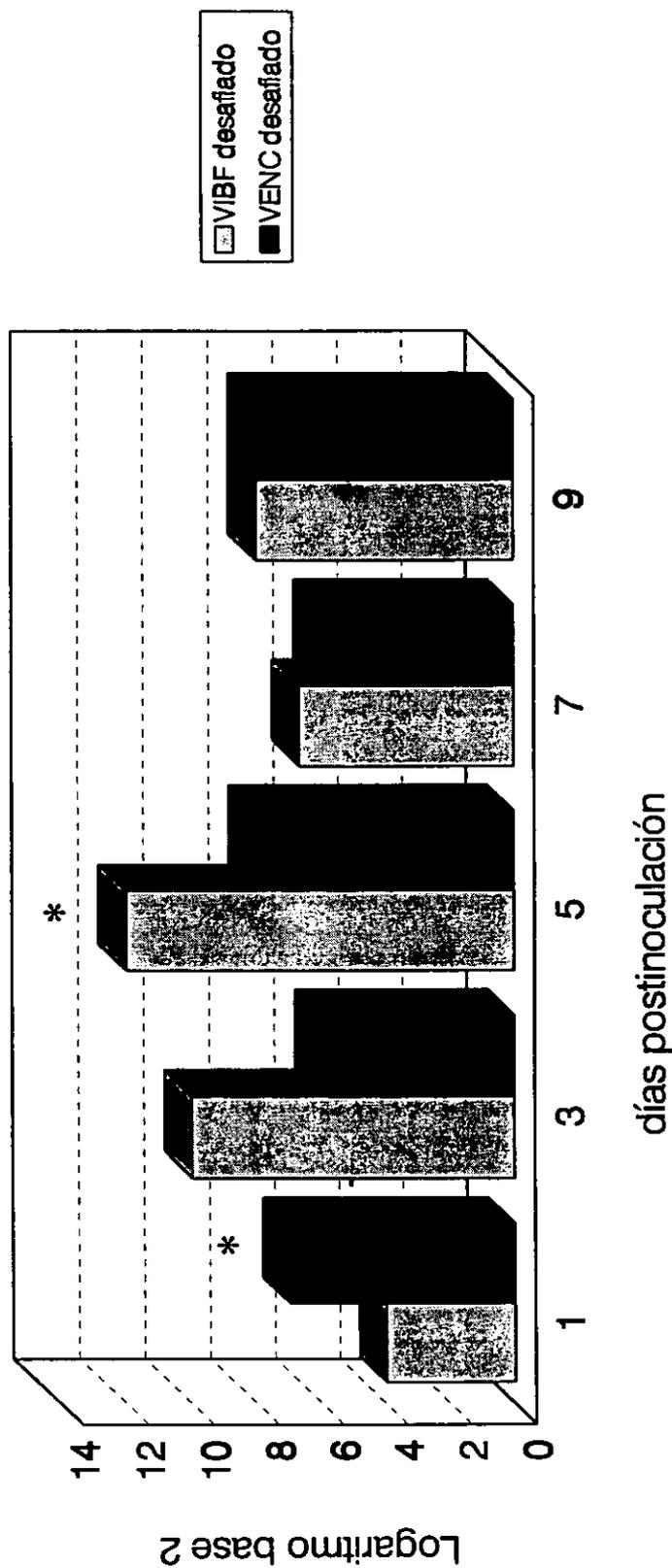
[Tomado de Farrell y col. Proc Nat Acad Sci 1978; 75:5896 Adap. Marco A. Juárez E. DPA:Aves.

Figura 3.- Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en columnas de fibra de nilón provenientes de una infección primaria con *Eimeria tenella* en pollo de engorda.



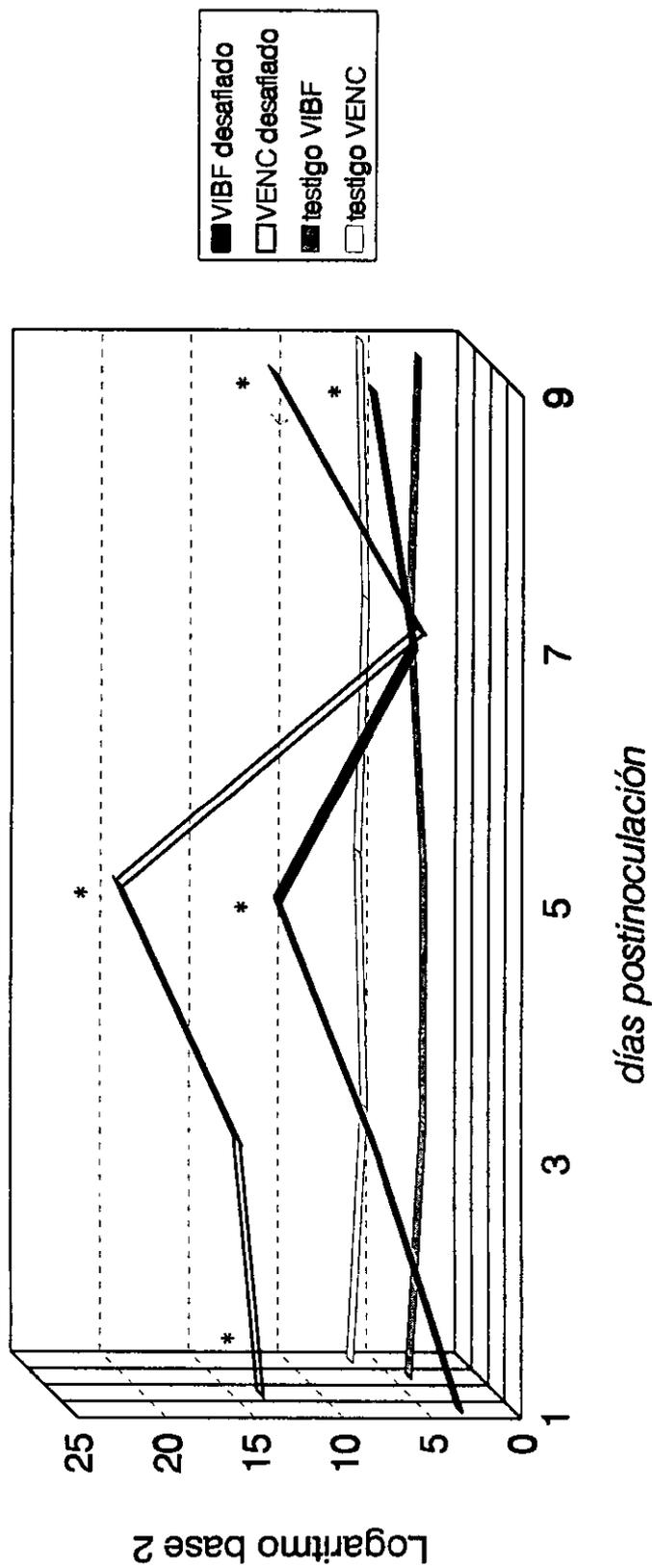
Las aves fueron desafiadas con 10,000 ooquistes esporulados al día 20 de edad. Los valores de cada día de muestreo se obtuvieron del promedio de tres réplicas del ensayo antiviral del sobrenadante obtenido de cada conglomerado celular. Los promedios de los títulos de IFN en cada ensayo antiviral del grupo desafiado se compararon con los promedios del grupo testigo no desafiado por medio de la prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas significativas se expresan con asterisco ($p < 0.05$).

Figura 4.- Comparación entre los ensayos antivirales empleados en la determinación de interferón producido por linfocitos purificados en columnas de fibra de nilón durante la primoinfección con *Eimeria tenella*.



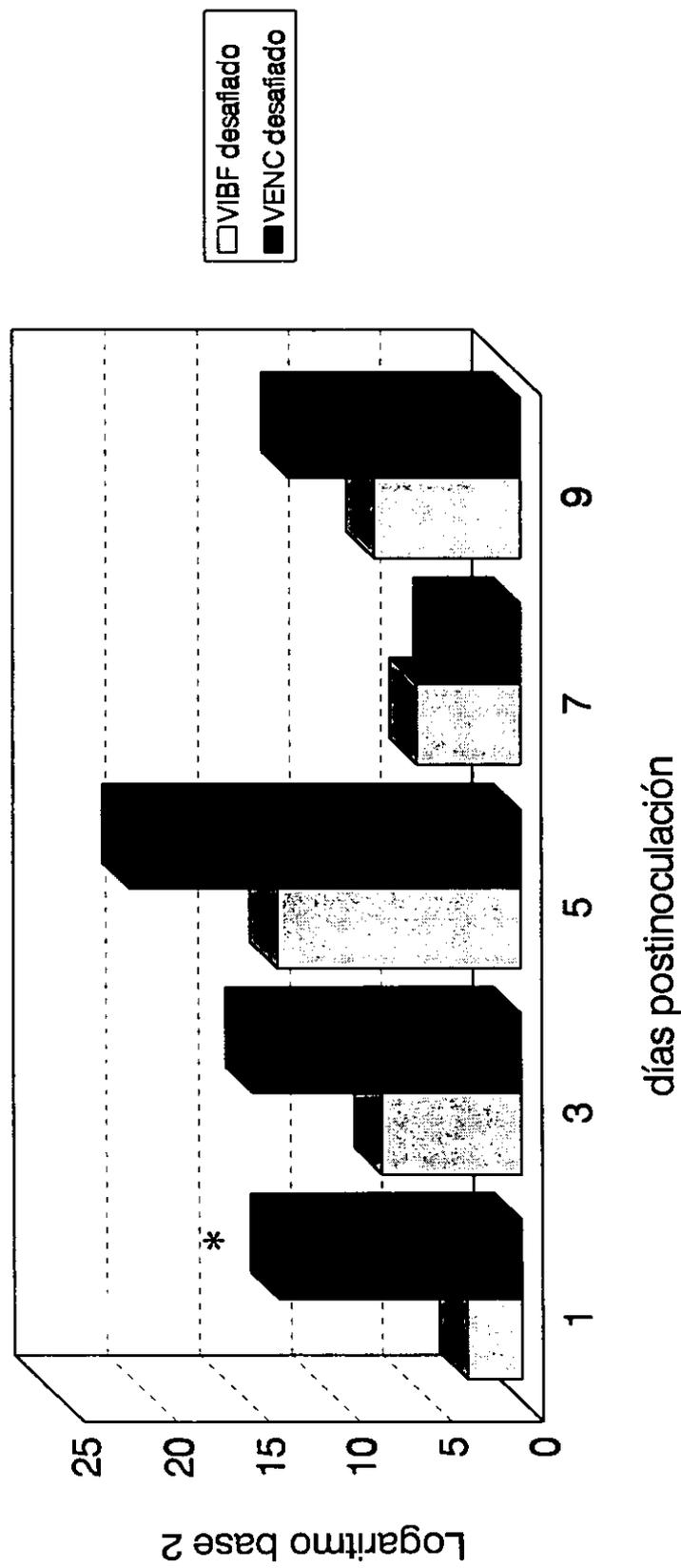
En cada día de muestreo los promedios de los ensayo antivirales se compararon entre sí por medio de un análisis de varianza, las diferencias entre medias se determinaron con la prueba t de Student. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 5.- Producción de interferón por linfocitos esplénicos purificados en gradientes de ficoll hypaque durante una infección primaria con *Eimeria tenella* en pollo de engorda.



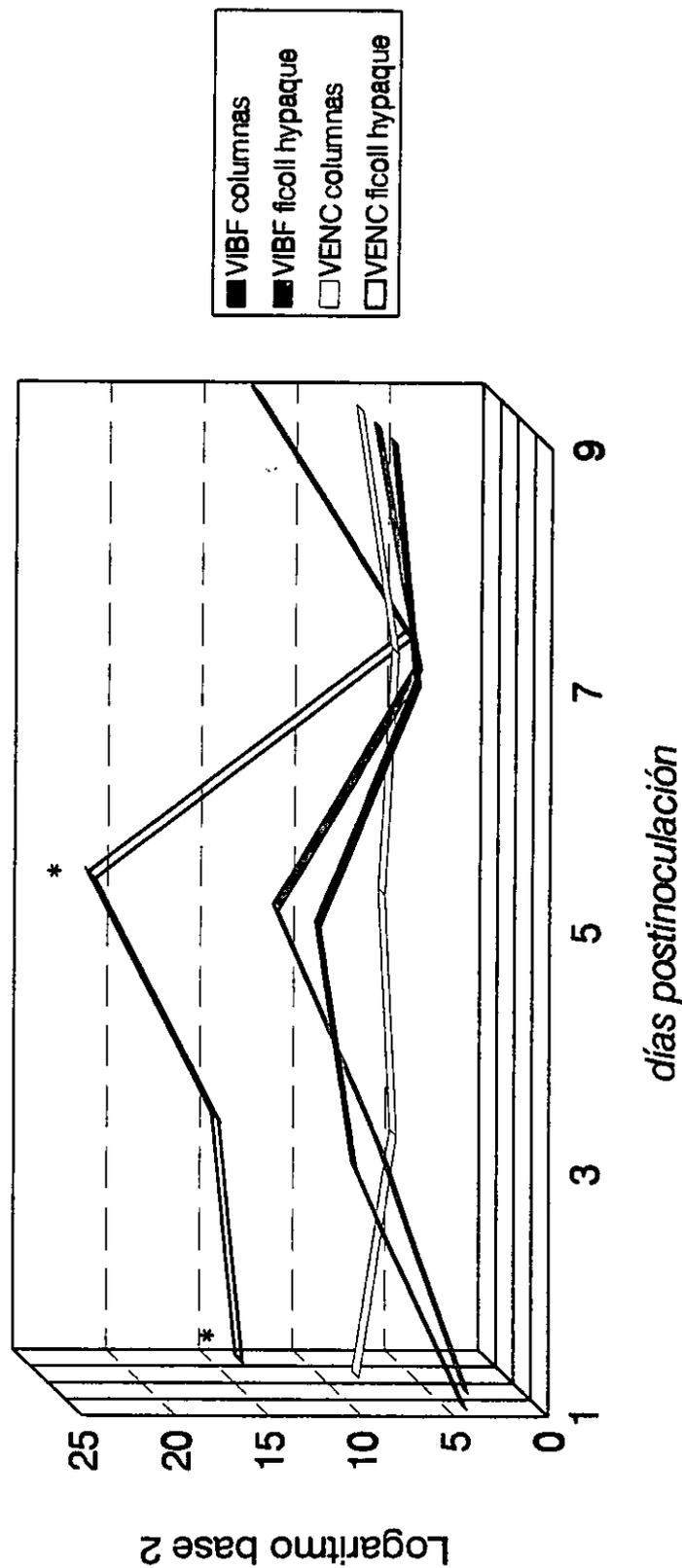
Las aves fueron desafiadas con 10,000 ooquistes esporulados al día 20 de edad. Los valores de cada día de muestreo se obtuvieron del promedio de tres réplicas del ensayo antiviral del sobrenadante obtenido a partir del cultivo celular de cada ave. Los promedios de cada ensayo antiviral del grupo desafiado se compararon con el promedio del grupo testigo no desafiado a través de la prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 6.- Comparación entre los ensayos antivirales empleados en determinar el interferón producido por linfocitos purificados en gradientes de ficoll hypaque durante la infección primaria con *Eimeria tenella*.



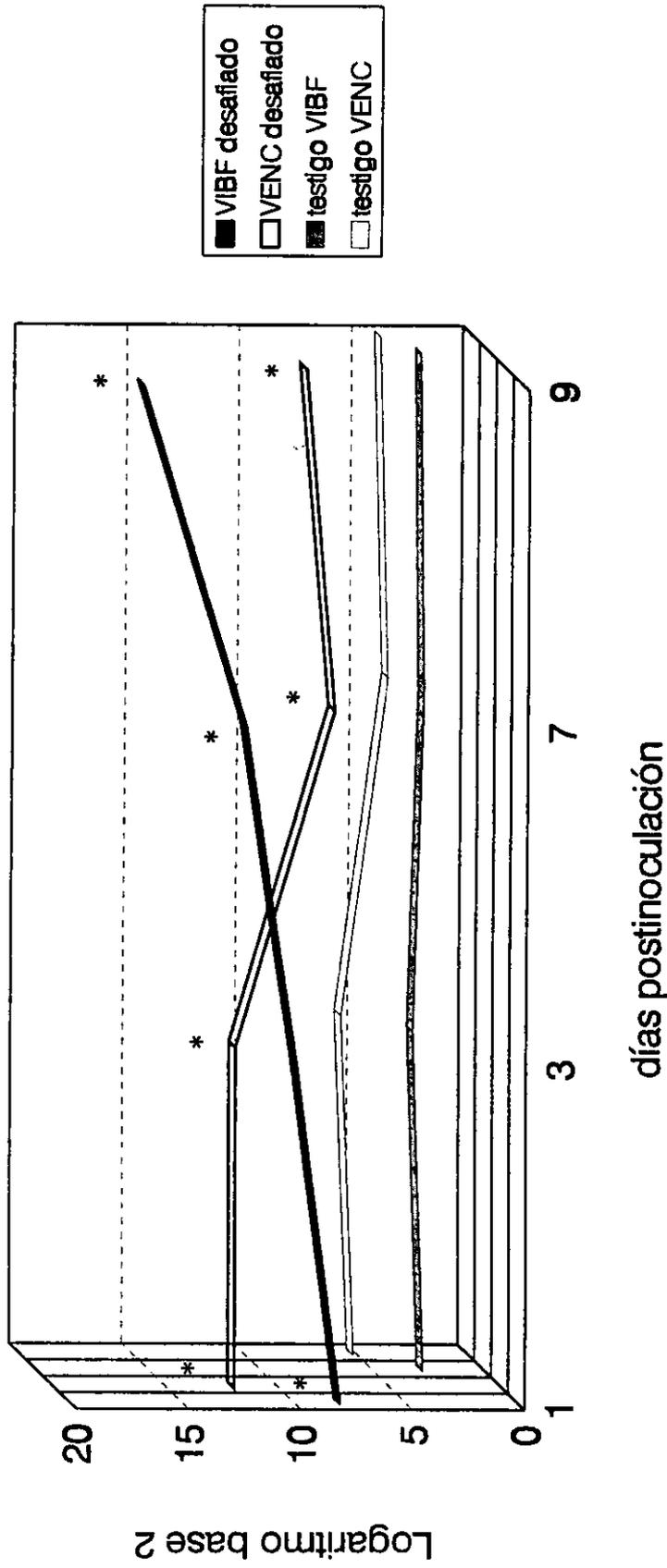
Los promedios de cada día de muestreo se sometieron a un análisis de varianza, las diferencias entre medias se determinaron con la prueba t de Student. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 7.- Comparación de interferón determinado con el mismo ensayo antiviral en linfocitos aislados en columnas de fibra de nilón o en gradientes de ficoll hyapaque durante la infección primaria con *Eimeria tenella*.



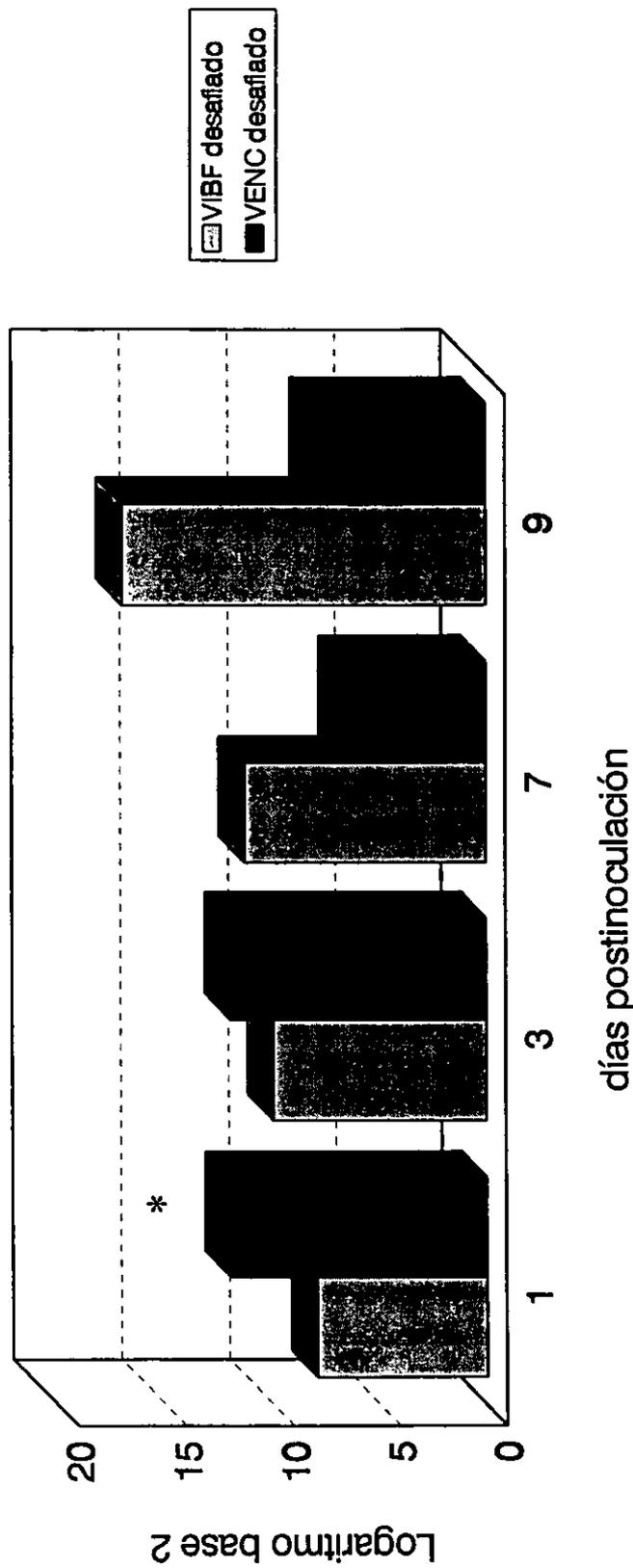
Los promedios de los títulos de IFN obtenidos en cada ensayo antiviral del primer estudio experimental se compararon con los respectivos promedios de los ensayos antivirales obtenidos en el segundo estudio experimental por medio de la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 8.- Producción de interferón por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria de *Eimeria tenella* en pollo de engorda.



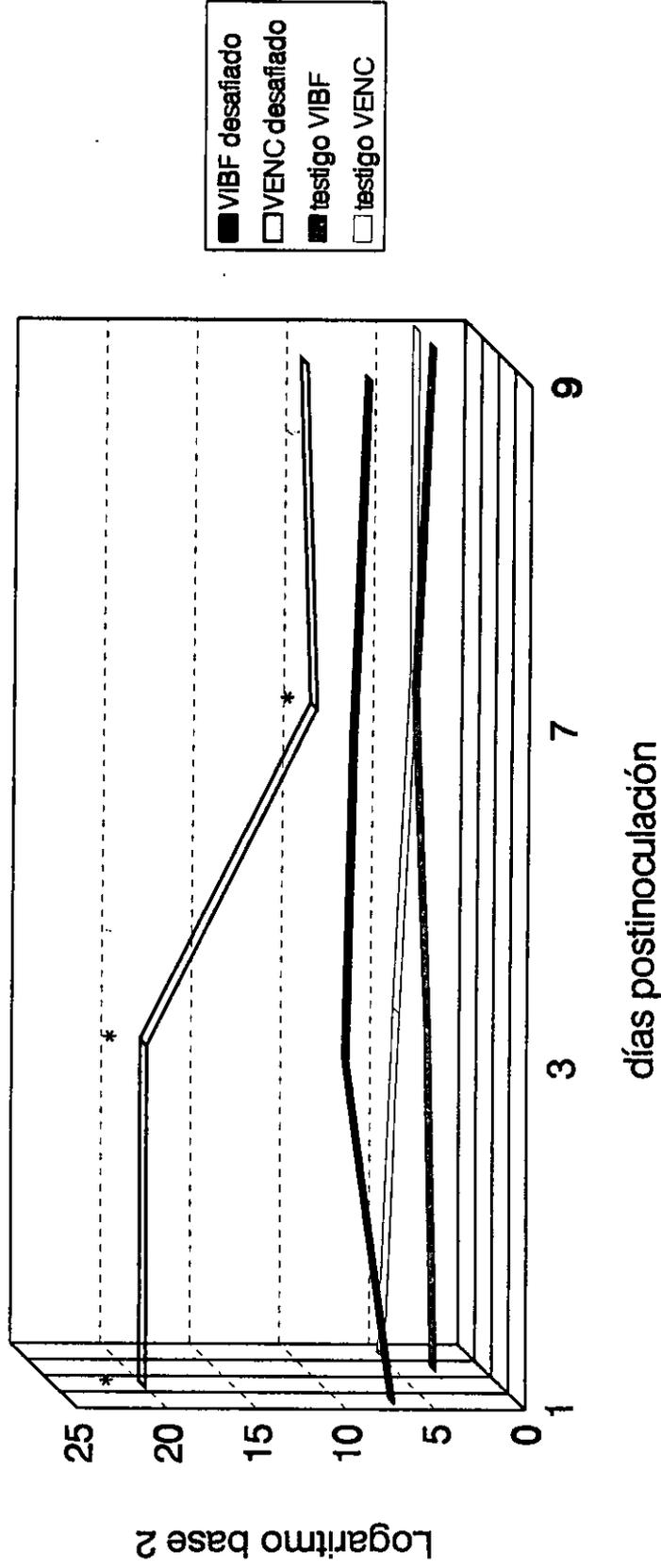
Las aves fueron previamente desafiadas con una dosis única de 10,000 ooquistes esporulados al día 20 de edad. Posteriormente fueron desafiadas con 50,000 ooquistes esporulados al día 34 de edad. Los promedios del título de IFN de cada ensayo antiviral del grupo desafiado se compararon con el promedio del grupo testigo no desafiado por medio de la prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 9.- Comparación entre los ensayos antivirales empleados en la determinación del interferón producido por linfocitos esplénicos durante la infección secundaria con *Eimeria tenella* con una única inmunización previa.



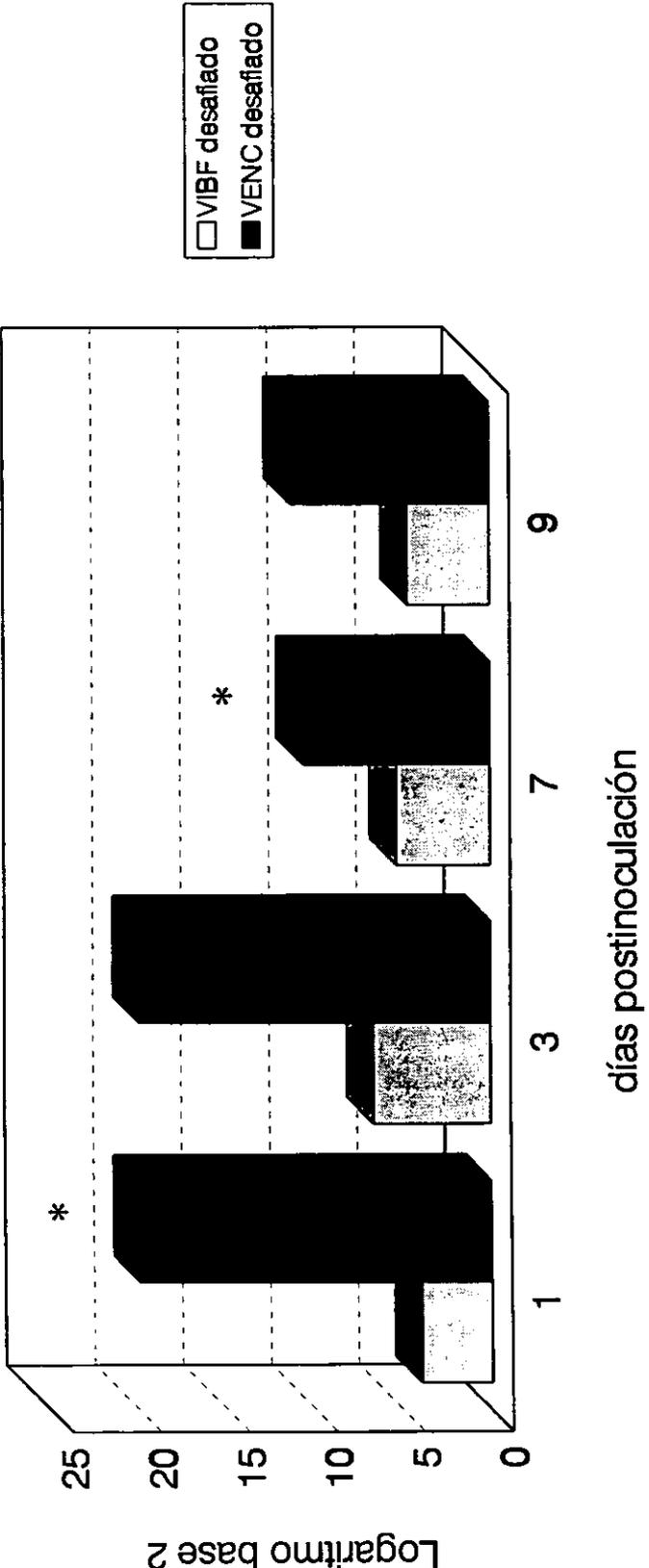
Las aves fueron previamente desafiadas con una dosis única de 10,000 ooquistes esporulados al día 20 de edad, al día 34 de edad se desafiaron con 50,000 ooquistes esporulados. Los promedios de cada día de muestreo se sometieron a un análisis de varianza, las medias se compararon con la prueba t de Student. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 10.- Producción de interferón por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria de *Eimeria tenella* en pollos de engorda previamente inmunizados (programa de refuerzo).



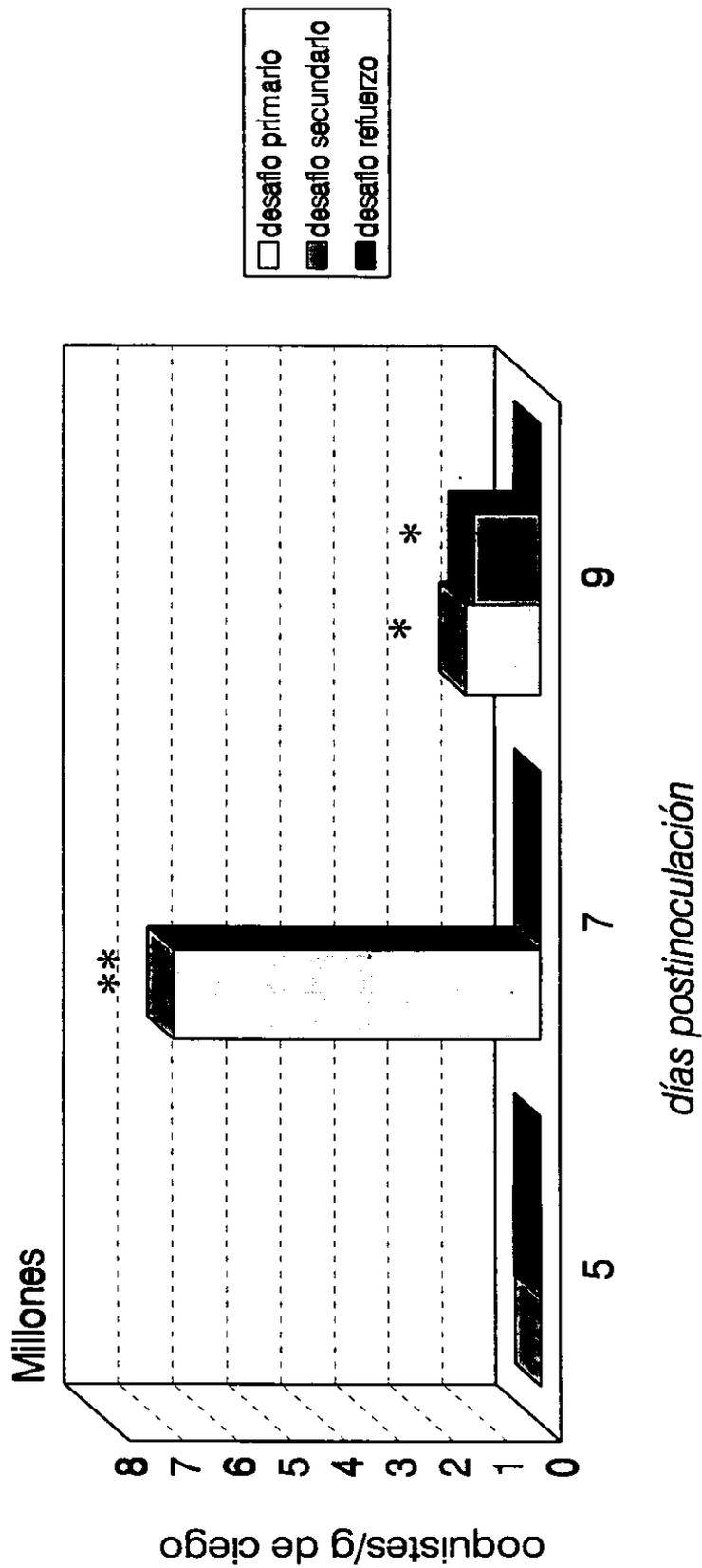
Las aves fueron previamente inmunizadas con 1000 ooquistes diarios durante 10 días, se dejó un periodo igual sin inmunizar y al día 30 de edad se desafiaron con 50,000 ooquistes esporulados. Los promedios del título de IFN de cada ensayo antiviral del grupo desafiado se compararon con el promedio del grupo testigo no desafiado por medio de la prueba de Dunnett. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 11.- Comparación entre los ensayos antivirales utilizados en la determinación de interferón producido por linfocitos esplénicos durante una infección secundaria con *Eimeria tenella* (programa de refuerzo).



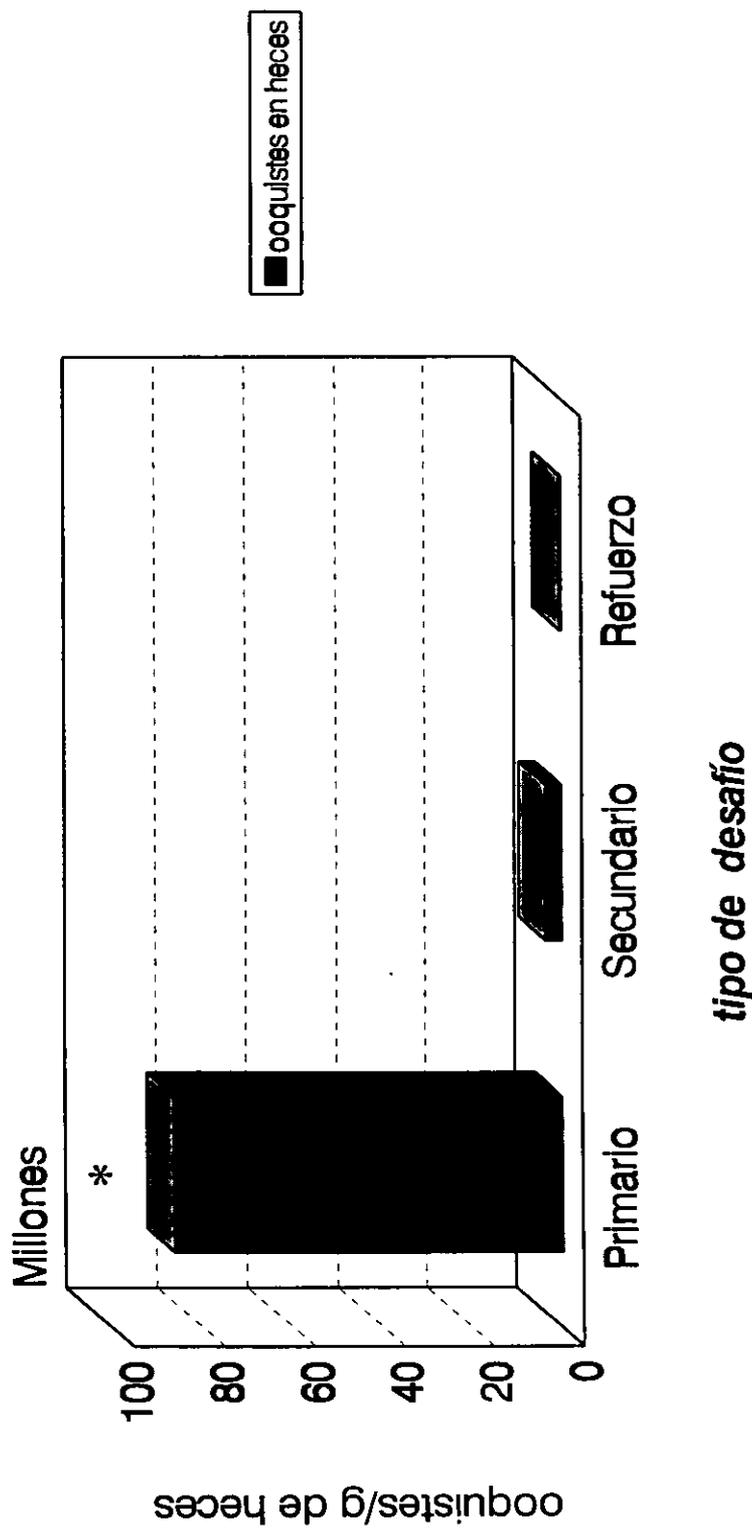
Las aves fueron previamente inmunizadas con 1000 ooquistes diarios durante 10 días, se dejó un periodo igual sin inmunizar y al día 30 de edad se desafiaron con 50,000 ooquistes esporulados. Los promedios de cada día de muestreo se sometieron a un análisis de varianza, la comparación entre medias se realizó con la prueba T de Student. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) se expresan con asterisco.

Figura 12.- Determinación de ooquistes de *Eimeria tenella* en ciego con la cámara de Neubauer en tres diferentes modelos de infección .



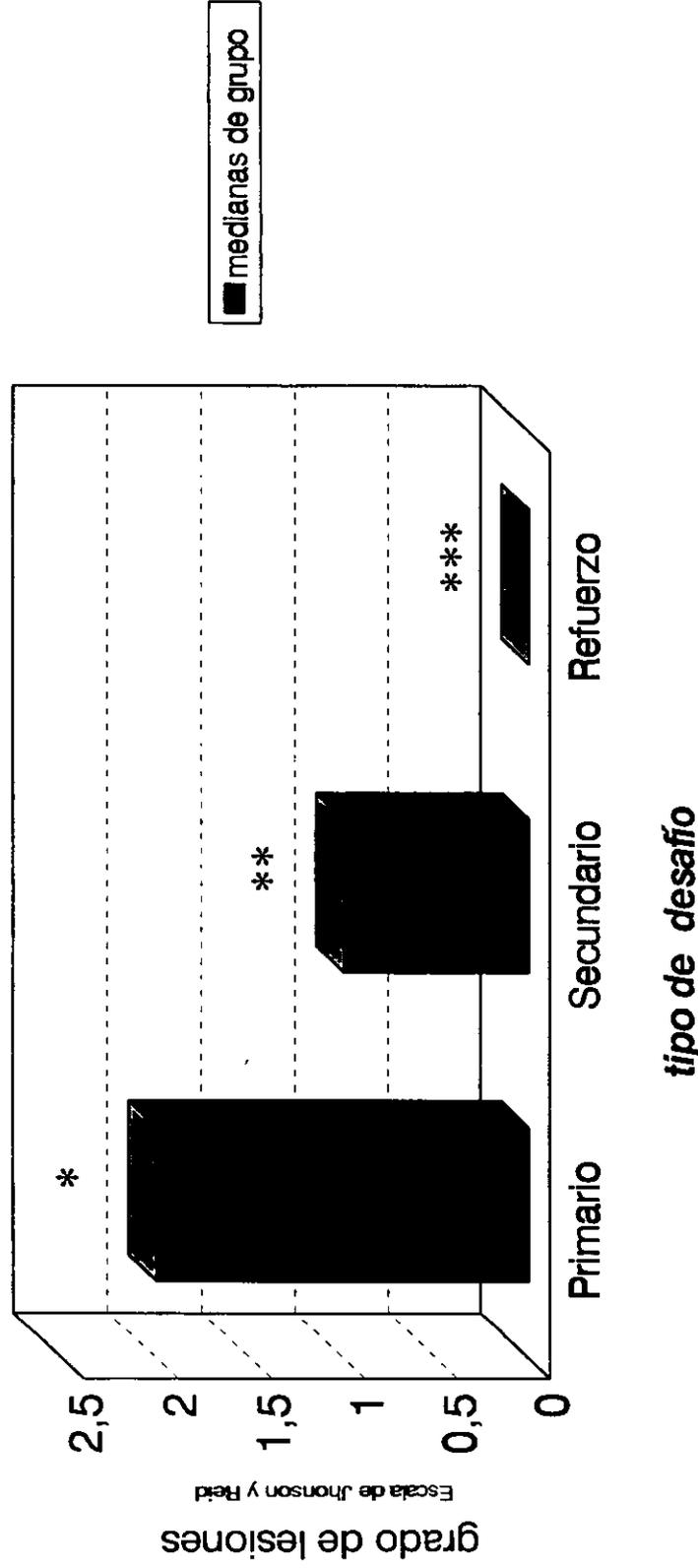
Los promedios de cada día de muestreo se sometieron a un análisis de varianza, la comparación entre medias se realizó con la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas significativas se expresan con asterisco * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Figura 13.- Determinación de ooquistes de *Eimeria tenella* en heces con la cámara de McMaster a partir de tres diferentes modelos de infección.



Los promedios de muestreo al día 7 postinoculación se sometieron a un análisis de varianza, la comparación entre medias se realizó con la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) se expresan con asterisco.

Figura 14.- Severidad de lesiones cecales en pollos infectados con *Eimeria tenella* en tres diferentes modelos de infección.



La evaluación de lesiones al día 7 postinoculación se sometió a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, las diferencias estadísticas significativas entre medianas se determinaron con la prueba U de Mann-Whitney las cuales se expresan con asteriscos: desafío primario *versus* desafío secundario* $p=0.0023$ desafío secundario *versus* desafío refuerzo** $p=0.00057$ desafío primario *versus* desafío refuerzo*** $p=0.0000020$

Cuadro 1. Comparación de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos aislados con columnas de fibra de nilón en dos ensayos antivirales a los 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección primaria con *Eimeria tenella*.

Grupos de tratamiento	Días post inoculación.	Número de aves	Medias en logaritmo base 2 ± desviación estándar A		
			VIBF C	VENC C	VENC C
Interf. Ref. B	-	-	16.00 ± (1.32) a	16.00 ± (2.21) a	
Infectado	1	8	4.00 ± (0.00) de	8.00 ± (0.00) b	
Infectado	3	8	10.00 ± (6.57) bc	6.00 ± (2.19) bc	
Infectado	5	8	12.00 ± (4.38) ab	6.67 ± (2.06) bc	
Infectado	7	8	6.67 ± (2.06) cd	6.00 ± (2.19) c	
Infectado	9	8	8.00 ± (0.00) bc	8.00 ± (4.38) c	
Sin infectar	-	8	3.00 ± (1.09) e	3.33 ± (1.03) d	

A En cada ensayo antiviral se realizó análisis de varianza con base en la raíz cuarta del \log_2 del título de interferón.

B Como control positivo se utilizó interferón de referencia (1^{er} Ifn Ref prep Inter Chick 67/18).

C Valores dentro de cada columna seguidos por diferente literal son significativamente diferentes, $p < 0.05$ (Duncan).

Cuadro 2. Respuesta de la protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos aislados con gradientes de ficoll hypaque a los 1, 3, 5, 7 y 9 días después de la infección primaria con *Eimeria tenella*.

Grupos de tratamiento	Días post inoculación.	Número de aves	Medias en logaritmo base 2 ± desviación estándar A		
			VIBF C	VIBF C	VENC C
Interf. Ref. B	-	-	16.00 ± (1.32) a	16.00 ± (2.21) a	
Infectado	1	8	3.00 ± (1.09) c	13.33 ± (4.13) a	
Infectado	3	8	7.60 ± (7.67) bc	14.67 ± (13.54) a	
Infectado	5	8	13.33 ± (4.13) abc	21.33 ± (12.04) a	
Infectado	7	8	5.67 ± (5.06) abc	4.33 ± (1.97) b	
Infectado	9	8	8.00 ± (0.00) ab	12.67 ± (5.32) a	
Sin infectar	-	8	3.67 ± (0.82) bc	5.33 ± (2.06) b	

A En cada ensayo antiviral se realizó análisis de varianza con base en la raíz cuarta del log₂ del título de interferón.

B Como control positivo se utilizó interferón de referencia (1^{er} In Ref prep Inter Chick 67/18).

C Valores dentro de cada columna seguidos por diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (Duncan).

Cuadro 3. Comparación de la respuesta de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos en dos ensayos antivirales a los 1, 3, 7 y 9 días después de la infección secundaria con *Eimeria tenella*.

Grupos de tratamiento	Días post inoculación.	Número de aves	Medias en logaritmo base 2 ± desviación estándar ^A		
			VIBF C	VENC C	VENC C
Interf. Ref. B	-	-	16.00 ± (1.32) a	16.00 ± (2.21) a	16.00 ± (2.21) a
Infectado	1	8	3.00 ± (1.09) a	13.33 ± (4.13) ab	13.33 ± (4.13) ab
Infectado	3	8	7.60 ± (7.67) a	14.67 ± (13.54) ab	14.67 ± (13.54) ab
Infectado	7	8	5.67 ± (5.06) a	4.33 ± (1.97) c	4.33 ± (1.97) c
Infectado	9	8	8.00 ± (0.00) a	12.67 ± (5.32) bc	12.67 ± (5.32) bc
Sin infectar	-	8	3.67 ± (0.82) b	5.33 ± (2.06) c	5.33 ± (2.06) c

A En cada ensayo antiviral se realizó análisis de varianza con base en la raíz cuarta del log₂ del título de interferón.

B Como control positivo se utilizó interferón de referencia (1st Ifn Ref prep Inter Chick 67/18).

C Valores dentro de cada columna seguidos por diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (Duncan).

Cuadro 4. Respuesta de protección antiviral en sobrenadantes de linfocitos esplénicos de pollo de engorda previamente inmunizados con *Eimeria tenella* a los 1, 3, 7 y 9 días después de una infección secundaria.

Medias en logaritmo base 2 ± desviación estándar A					
Grupos de tratamiento	Días post inoculación.	Número de aves	VIBFC	VIFC	VENC c
Interf. Ref. B	-	-	16.00 ± (1.32) a		16.00 ± (2.21) a
Infectado	1	8	4.00 ± (0.00) b		20.00 ± (13.14) a
Infectado	3	8	6.67 ± (2.06) ab		20.00 ± (13.85) a
Infectado	7	8	5.33 ± (2.06) b		10.66 ± (4.13) ab
Infectado	9	8	4.67 ± (3.01) b		11.33 ± (11.14) ab
Sin infectar	-	8	4.00 ± (2.53) b		5.00 ± (2.45) b

A En cada ensayo antiviral se realizó análisis de varianza con base en la raíz cuarta del log₂ del título de interferón.

B Como control positivo se utilizó interferón de referencia (1st Ifn Ref prep Inter Chick 67/18).

C Valores dentro de cada columna seguidos por diferente literal son significativamente diferentes, p<0.05 (Duncan).

Cuadro 5. Conteo comparativo de la cantidad de ooquistes con la cámara de Neubauer en ciegos de aves infectadas experimentalmente con *Eimeria tenella* al día 5, 7 y 9 postinoculación, en tres diferentes modelos de infección.

Tipo de desafío	Número de aves	Media de ooquistes \pm desviación estándar A,B
Desafío primario	47	2,615,804 \pm (3,260,056)a
Desafío secundario	53	352,478 \pm (813302)b
Desafío refuerzo	30	3,564 \pm (9,002)b

A Promedio en miles de ooquistes por gramo de ciego.

B Los valores dentro de una columna seguidos por diferente literal son estadísticamente diferentes, $p < 0.001$ (Tukey)

Cuadro 6. Conteo comparativo de ooquistes en heces con la cámara de McMaster al día 7 después de la inoculación con *Eimeria tenella* en tres diferentes modelos de infección.

Tipo de desafío	Número de aves	Media de ooquistes \pm desviación estándar A, B
Desafío primario	10	86,476,190 \pm (12,716,360)a
Desafío secundario	10	3,606,349 \pm (272,683)b
Desafío refuerzo	10	357,143 \pm (189,262)b

A Promedio en miles de ooquistes por gramo de heces.

B Los valores dentro de una columna seguidos por diferente literal son estadísticamente diferentes, $p < 0.001$ (Tukey)